

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

Juceli Müller

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. A  
SEMENTES DE SORGO SACARINO**

**Santa Maria, RS  
2017**

**Juceli Müller**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. A  
SEMENTES DE SORGO SACARINO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Agronomia**

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Russi Nunes

**Santa Maria, RS  
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Müller, Juceli  
Qualidade fisiológica e associação de *Fusarium* spp. a sementes de sorgo sacarino / Juceli Müller.- 2017.  
96 p.; 30 cm

Orientador: Ubirajara Russi Nunes  
Coorientadores: Marlove Fátima Brião Muniz, Sidinei José Lopes  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2017

1. *Sorghum bicolor* (L.) Moench 2. *Fusarium thapsinum*  
3. Identificação molecular I. Nunes, Ubirajara Russi II. Muniz, Marlove Fátima Brião III. Lopes, Sidinei José IV. Título.

---

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Juceli Müller. A reprodução de partes ou de todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Email: [juceli.muller@yahoo.com.br](mailto:juceli.muller@yahoo.com.br)

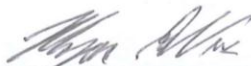
---

Juceli Müller

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. A SEMENTES  
DE SORGO SACARINO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Agronomia**

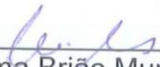
**Aprovado em 07 de abril de 2017:**



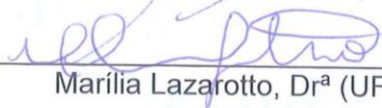
\_\_\_\_\_  
**Ubirajara Russi Nunes, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



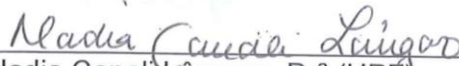
\_\_\_\_\_  
Rogério Luis Backes, Dr. (UFSM)



\_\_\_\_\_  
Marlove Fátima Brião Muniz, Dr<sup>a</sup> (UFSM)



\_\_\_\_\_  
Marília Lazarotto, Dr<sup>a</sup> (UFRGS)



\_\_\_\_\_  
Nadia Canali Lângaro, Dr<sup>a</sup> (UPF)

**Santa Maria, RS  
2017**

## DEDICATÓRIA

*A meus pais Irineu e Marlene e minha irmã Juliane. Ofereço também aos demais familiares, que sempre acreditaram e torceram em todos os momentos, e aos meus amigos, por toda ajuda.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, pela força e fé para superar todos os desafios.*

*À Universidade Federal de Santa Maria, ao Curso de Agronomia e ao Programa de Pós-Graduação pelo acolhimento e oportunidades oferecidas durante todos estes anos, bem como a todos os professores que fizeram parte da minha formação.*

*Em especial, ao professor Dr. Ubirajara Russi Nunes pela compreensão, paciência, orientação e ensinamentos durante todos os anos.*

*Aos meus pais, Irineu e Marlene, e minha irmã Juliane, minha Família, meu porto seguro e que sempre, mesmo a distância, estão comigo nesta caminhada. Obrigada pelo amor, pelo carinho, pela confiança, pelo apoio e incentivo em todas as horas.*

*Amo vocês!*

*À todos meus tios, primos, primas, afilhados, vó, muta (in memorian) pelo carinho de sempre.*

*À gerência da Emater/Ascar-RS, regional Passo Fundo, pela liberação em todos os momentos solicitados, e aos colegas pelo incentivo, apoio e compreensão durante estes anos.*

*Agradeço imensamente a Pâmela, que me ajudou na condução dos trabalhos, meu lado direito em todas as atividades, sempre disposta, prestativa, competente e responsável. Com certeza a caminhada seria ainda mais árdua sem a sua ajuda.*

*Ao Tales Poletto por toda ajuda e carinho, e paciência.*

*À Tiele e a Lovane pela recepção no Laboratório, pela ajuda e disponibilidade em todos os momentos nestes anos.*

*À Fernanda que me acolheu na sua casa, ajudou nos trabalhos, esteve sempre presente, também nos momentos de descontração. Da mesma forma, minha amiga Elisandra e sua mãe... por todo carinho e amizade dos anos de convivência.*

*Ao grupo de pesquisa do Laboratório Didático de Análises de Sementes, por toda ajuda na condução dos trabalhos (não esquecendo jamais as horas passadas debulhando, lixando e limpando as sementes de sorgo), pelo carinho, pela troca de experiências, e que me receberam com muito afeto. Sentirei saudades... Tiele, Lovane, Joner, Silvia, Vitor, Eduardo, Ana Paula, Paula, entre outros.*

*Ao pessoal do Laboratório de Fitopatologia, que sempre me acolheu da melhor forma possível, fazendo me sentir 'em casa novamente'.... Maria, Felipe, Jéssica, Pâmela, Ricardo...*

*Aos amigos que estão sempre no meu coração: Lenise, Sibila, Samantha, Emanuele, Daniele, pela amizade e carinho mantidos por estes longos anos. E que muitos outros venham...*

*Ao meu namorado Leandro e sua família, pelo incentivo, pela compreensão (principalmente nos últimos dias) e pela companhia nos bons momentos.*

*Aos novos amigos deste último ano, que entenderam, incentivaram e torceram para que tudo sempre desse certo: Rosane, Dilvana, Mariana, Andreia, Arieli.*

*Enfim, a todos que torceram e/ou participaram de alguma forma destes anos e destes momentos especiais,*

*Muito obrigada!!!!*

*O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim:  
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta. O que ela quer  
da gente é coragem.*

*(Guimarães Rosa)*



## RESUMO

# QUALIDADE FISIOLÓGICA E ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. A SEMENTES DE SORGO SACARINO

AUTORA: Juceli Müller

ORIENTADOR: Ubirajara Russi Nunes

O presente trabalho teve como objetivo determinar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cultivares de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), bem como identificar os patógenos associados à semente, sua transmissão às plântulas e a posterior patogenicidade de isolados obtidos, além disso, identificar molecularmente as espécies fúngicas patogênicas a esta cultura. Os experimentos foram realizados no Laboratório Didático e de Pesquisas em Sementes (LDPS), do Departamento de Fitotecnia; no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, do Departamento de Defesa Fitossanitária e, no Instituto Biológico de São Paulo. Foram utilizadas sementes de sorgo sacarino, todas sem tratamento químico. A qualidade sanitária foi avaliada pelo teste de sanidade, e as características fisiológicas por meio dos testes de germinação e de vigor (comprimento de plântulas, massa seca, emergência, índice de velocidade de emergência e envelhecimento acelerado). Foi realizado o teste de transmissão dos patógenos associados à semente e a posterior patogenicidade dos isolados fúngicos obtidos, culminando com a caracterização molecular dos patógenos identificados, na qual foram sequenciadas as regiões genômicas *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e o gene do fator de alongação 1- $\alpha$  (TEF1 $\alpha$ ). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro cultivares de sorgo sacarino (BRS 506, Fepagro 19, BRS 511 e BRS 509); já para a avaliação da patogenicidade, o esquema fatorial foi representado pelas quatro cultivares e três isolados de *Fusarium* sp., além da testemunha. As sementes da cultivar BRS 509 foram consideradas de qualidade fisiológica inferior as demais cultivares. O sequenciamento de DNA permitiu identificar a espécie *Fusarium thapsinum* como agente patogênico na cultura do sorgo sacarino, sendo comprovada sua transmissão via sementes.

**Palavras-chave:** *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Teste de transmissão. *Fusarium thapsinum*. Regiões genômicas *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Fator de alongação 1- $\alpha$ .

## ABSTRACT

### PHYSIOLOGICAL QUALITY AND ASSOCIATION OF *Fusarium* spp. WITH SEEDS OF SWEET SORGHUM

AUTHOR: Juceli Müller  
ADVISOR: Ubirajara Russi Nunes

The present work aims to determine the physiological and sanitary quality of Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) seeds, as well as to identify pathogens associated with seed, their transmission to seedlings and the subsequent pathogenicity of isolates obtained. In addition, molecularly identify the fungal species pathogenic to this crop. The experiments were carried out in the Teaching and Seed Research Laboratory (TSRL), of the Plant Engineering Department; In the Elocy Minussi Phytopathology Laboratory, Department of Plant Protection, and at the Biological Institute of São Paulo. Sweet sorghum seeds were used, all without chemical treatment. Sanitary quality was evaluated by sanity test, and physiological characteristics by germination and vigor tests (seedling length, dry mass, emergence, rate of emergence and accelerated aging). It was performed the test of transmission of the pathogens associated to the seeds and the subsequent pathogenicity of the obtained isolates, culminating with the molecular characterization of the identified pathogens, in which were sequenced the Internal Transcribed Spacer (ITS) genomic regions and the Elongation Factor 1 - alpha (TEF1- $\alpha$ ) gene. The design used was the completely randomized design, with four cultivars of Sweet sorghum (BRS 506, F19, BRS 511 and BRS 509); For the evaluation of pathogenicity, the factorial scheme is represented by four cultivars and three isolates of *Fusarium* spp., besides the witness. The seeds of the BRS 509 cultivar were considered to have lower physiological quality than the other cultivars. The DNA sequencing allowed identifying the *Fusarium thapsinum* species as a pathogenic agent in the sweet sorghum crop, and proven its transmission via seeds.

**Key words:** *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Transmission test. *Fusarium thapsinum*. Internal Transcribed Spacer (ITS) Genomic regions. Elongation factor 1- $\alpha$ .

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Instalação e condução do teste de transmissão de patógenos sem inoculação via semente de sorgo sacarino. ....	44
Figura 2 – Sementes de sorgo sacarino em contato com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e contendo micélio de <i>Fusarium</i> sp.....	46
Figura 3 – Valores decêndiais de temperatura média do ar e precipitação pluviométrica durante o ciclo de cultivo do sorgo sacarino safra 2013/2014, Santa Maria, RS, 2017. ....	49
Figura 4 – Sintomas causados por <i>Fusarium</i> sp. em plântulas de sorgo sacarino, Santa Maria, RS.....	59
Figura 5 – Plântulas ao final do teste de patogenicidade com três isolados de <i>Fusarium</i> sp. e a testemunha, realizadas com sementes de sorgo sacarino, safra 2013/2014, Santa Maria, RS.....	62
Figura 6 – Sintomas causados pela associação com <i>Fusarium</i> sp. em sementes e plântulas de sorgo sacarino. ....	63
Figura 7 – Dendrograma filogenético baseado no método Neighbor-joining a partir de sequências de DNA do fator de alongação 1- $\alpha$ . O número sobre os ramos indica a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).....	66
Figura 8 – Dendrograma filogenético baseado no método Neighbor-joining a partir de sequências de DNA da região ITS. O número sobre os ramos indica a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). ....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primeira contagem da germinação (PCG), germinação de plântulas normais (GER), plântulas anormais (PAN), sementes mortas (SM), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento radicular (CPR), comprimento total (CTO), massa seca de plântula (MSP), envelhecimento acelerado (EA), emergência (E), comprimento de parte aérea da emergência (CPAE), massa seca de plântula da emergência (MSPE) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de sorgo sacarino.....	51
Tabela 2 – Sementes totais infestadas por microrganismos fúngicos e os principais gêneros associados às sementes de sorgo sacarino na avaliação da qualidade sanitária. ....	56
Tabela 3 – Média de plântulas normais (%) e plântulas com sintomas de <i>Fusarium</i> spp. (%) observadas no teste de transmissão de quatro cultivares de sorgo sacarino, safra 2013/2014, Santa Maria, RS.....	59
Tabela 4 – Emergência e plântulas sintomáticas do teste de patogenicidade com inoculação de <i>Fusarium</i> sp. em sementes de quatro cultivares de sorgo sacarino, safra 2013/2014, Santa Maria, RS.....	61
Tabela 5 – Acesso no GenBank, cobertura (%), similaridade (%), e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica do gene fator de alongação 1- $\alpha$ .....	65
Tabela 6 – Acesso no GenBank, cobertura (%), similaridade (%), e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS. ....	67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	SORGO SACARINO .....	15
2.2	PRODUÇÃO E QUALIDADE DE SEMENTES DE SORGO SACARINO .....	22
<b>2.2.1</b>	<b>Qualidade fisiológica de sementes de sorgo sacarino</b> .....	23
<b>2.2.2</b>	<b>Incidência de doenças na cultura e a qualidade sanitária das sementes de sorgo sacarino</b> .....	26
2.2.2.1	<i>Transmissão e identificação genética de patógenos</i> .....	30
2.2.2.2	<i>Fusarium spp.</i> .....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
3.1	ORIGEM DAS SEMENTES E LOCAL DOS EXPERIMENTOS .....	39
3.2	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FÍSICA E FISIOLÓGICA .....	40
<b>3.2.1</b>	<b>Teor de água</b> .....	40
<b>3.2.2</b>	<b>Teste de Germinação</b> .....	40
<b>3.2.3</b>	<b>Comprimento de plântulas na germinação</b> .....	40
<b>3.2.4</b>	<b>Massa seca de plântulas na germinação</b> .....	41
<b>3.2.5</b>	<b>Emergência de plântulas</b> .....	41
<b>3.2.6</b>	<b>Índice de velocidade de emergência (IVE)</b> .....	41
<b>3.2.7</b>	<b>Comprimento de plântula na emergência</b> .....	42
<b>3.2.8</b>	<b>Massa seca de plântulas na emergência</b> .....	42
<b>3.2.9</b>	<b>Envelhecimento acelerado</b> .....	42
3.3	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SANITÁRIA .....	43
<b>3.3.1</b>	<b>Teste de sanidade</b> .....	43
<b>3.3.2</b>	<b>Transmissão de patógenos sem inoculação</b> .....	43
<b>3.3.3</b>	<b>Patogenicidade</b> .....	45
3.3.3.1	<i>Isolamento de fungos</i> .....	45
3.3.3.2	<i>Inoculação</i> .....	45
3.3.3.3	<i>Avaliação</i> .....	47
<b>3.3.4</b>	<b>Caracterização molecular</b> .....	47
<b>3.3.5</b>	<b>Procedimentos estatísticos</b> .....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FISIOLÓGICA DAS SEMENTES DE SORGO SACARINO .....	49
4.2	CARACTERIZAÇÃO SANITÁRIA DAS SEMENTES DE SORGO SACARINO .....	56
<b>4.2.1</b>	<b>Teste de sanidade</b> .....	56
<b>4.2.2</b>	<b>Transmissão e patogenicidade de <i>Fusarium spp.</i></b> .....	58
<b>4.2.3</b>	<b>Identificação molecular de <i>Fusarium sp.</i></b> .....	64
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	73
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	74
	<b>ANEXO A – DESCRIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA</b> .....	89
	<b>ANEXO B – RESUMO DA ANOVA REFERENTE À TABELA 1</b> .....	90
	<b>ANEXO C – RESUMO DA ANOVA REFERENTE À TABELA 2</b> .....	93
	<b>ANEXO D – RESUMO DA ANOVA REFERENTE À TABELA 3</b> .....	95
	<b>ANEXO E – RESUMO DA ANOVA REFERENTE À TABELA 4</b> .....	96

## 1 INTRODUÇÃO

Recentemente, maior importância vem sendo dada ao cultivo do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) como uma alternativa para a produção de etanol. Esta cultura apresenta-se com uma série de vantagens, tais como: manejos similares à cana-de-açúcar, cultura totalmente mecanizável (desde o plantio até a colheita), implantação através de sementes, ciclo vegetativo curto (120 a 130 dias), colmos suculentos com teores elevados de açúcares fermentescíveis, tolerância à seca e à toxidez ao alumínio e produção de grãos para alimentação animal (PARELLA, 2011).

O cultivo do sorgo sacarino surge no período de entressafra da cana-de-açúcar, sendo a semeadura realizada nos meses de outubro e novembro, com colheitas de fevereiro a março, reduzindo assim o período de ociosidade das destilarias (3 a 5 meses) (DURÃES, 2011; PEREIRA FILHO et al., 2013). A diferença marcante entre as duas culturas é a utilização de sementes como forma de instalação da lavoura de sorgo sacarino. As sementes exercem um papel fundamental no desenvolvimento da cultura, sendo a qualidade fisiológica e sanitária os aspectos mais importantes a serem observados no momento de adquiri-las.

Contudo, é através das sementes que diversos patógenos podem ser transmitidos a novas áreas, causando perdas na qualidade e na quantidade de etanol produzido (MAY, 2011a). Nos processos industriais, toda a matéria prima é utilizada, sendo assim, a qualidade fitossanitária da semente, no campo de cultivo é importante, de modo a evitar perdas de área foliar e/ou prejudicando o rendimento fermentativo, por exemplo, por doenças fúngicas (GOMES; RODRIGUES; OLIVEIRA, 2011).

Alguns patógenos já estão descritos associadas às sementes de sorgo, como *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Cercospora* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., entre outros. No entanto, para o sorgo sacarino há limitações de informações relacionadas a identificação, transmissão e patogenicidade de microrganismos fúngicos associadas às mesmas. De acordo com Machado, Cassetari Neto e Guerra (2005), patógenos que se localizam no embrião das sementes apresentam chances maiores de serem transmitidos às plântulas. Se a transmissão do patógeno pela semente for eficiente, a planta desenvolverá a doença, o que poderá acarretar em

problemas na plântula ou na sua fase adulta, podendo também causar a morte destas.

As diferentes técnicas de caracterização molecular auxiliam na correta identificação destes patógenos, os quais, por meio de diferenças genéticas existentes entre eles, podem ser agrupados ou diferenciados. Assim sendo, o objetivo é a identificação eficiente de espécies, *formae specialis*, raças ou isolados (KUMARAE; SOUZA, 2002) de organismos patogênicos associados as sementes de sorgo sacarino, bem como relacioná-los a qualidade fisiológica das sementes das cultivares disponibilizadas. Métodos de pesquisas mais avançadas, como as identificações moleculares, são alternativas importantes para diagnosticar e conferir credibilidade aos resultados obtidos.

Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes provenientes de diferentes cultivares de sorgo sacarino e identificar os patógenos associados às sementes, sua transmissão às plântulas, a patogenicidade dos isolados obtidos e identificar molecularmente as espécies patogênicas a esta cultura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SORGO SACARINO

O cultivo do sorgo sacarino tornou-se uma alternativa importante para a produção de etanol (uma fonte de energia renovável produzida através da fermentação alcoólica dos açúcares), principalmente quando a demanda por combustíveis de fontes renováveis está em crescente expansão (DURÃES, 2011). A redução do volume de emissões de gases causadores do efeito estufa e a consequente pesquisa por meios alternativos faz com que essa cultura se destaque em muitos aspectos. Além disso, segundo Prasad et al. (2007), a demanda de etanol está aumentando drasticamente devido à sua mistura em combustíveis automotivos. De acordo com o autor, a instabilidade no preço do etanol também afeta as pesquisas na busca por fontes alternativas para a produção de etanol.

O sorgo sacarino é nativo da África, sendo as iniciativas de introdução desta gramínea no Brasil a partir de 1950. Em 1970 a Embrapa iniciou então um programa de melhoramento do sorgo, ano de implementação do Programa Pró-Álcool, considerado referência mundial na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, mas apenas em 1987 as primeiras cultivares brasileiras de sorgo sacarino foram desenvolvidas com potencial para produção de etanol.

Com o insatisfatório êxito do Pró-Álcool, o foco das pesquisas com sorgo sacarino foi redirecionado para a produção de cultivares forrageiras. Segundo Parrella (2011), foi somente a partir de 2008, devido ao potencial desta cultura na geração de energia renovável e a grande demanda por matéria-prima alternativa para a produção de etanol, é que a Embrapa Milho e Sorgo reiniciou seu programa de melhoramento de cultivares de sorgo sacarino, sendo que, em 2015, o sorgo ocupava uma área de 695,2 mil ha, com uma produtividade média de 2.673 kg/ha (CONAB, 2016).

A cana-de-açúcar é uma das culturas com potencial energético mais importante, sendo a estimativa de área a ser colhida, para a safra 2016/2017, de aproximadamente 9,1 milhões de hectares (aumento de 5,3% se comparada a safra de 2015/2016) e acima de 27,5 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2016). É no período de entressafra (de dezembro a abril) desta cultura, que o cultivo de sorgo



sacarino se destaca (MAY et al., 2012), principalmente pelo elevado preço do etanol nesta época. Segundo Durães (2011), os plantios no início do período de outubro e novembro, com colheitas a partir de fevereiro a março, torna possível a antecipação de 2 a 3 meses do período de moagem das usinas, reduzindo assim o período de ociosidade das destilarias (3 a 5 meses). Assim, o sorgo sacarino pode apresentar-se como uma importante cultura, complementar a cana-de-açúcar, para compor o programa energético brasileiro, com possibilidade de expansão da produção de bioenergia e maior eficiência na produção de etanol (MAY et al, 2012). Dessa forma, a cultura do sorgo sacarino vem para atuar de forma positiva na demanda de etanol, suprindo possíveis problemas de oferta, bem como, permitir que o preço se estabilize na entressafra, mantendo assim, a competitividade no mercado (SANTOS, 2013).

A produção de etanol no Brasil é totalmente dependente da produção e extração da cana-de-açúcar, assim, dependente também das boas condições climáticas do período de cultivo, contudo, condições desfavoráveis, como a seca ocorrida na região centro-sul entre os meses de dezembro e fevereiro na safra de 2014/2015, refletem diretamente no desenvolvimento da cultura, onde as baixas precipitações pluviométricas afetaram o perfilhamento da cultura, o desenvolvimento dos colmos, afetando assim a produtividade da cana-de-açúcar (FERREIRA, 2015). O incentivo ao cultivo do sorgo sacarino não tem como proposta a substituição da cana-de-açúcar por esta atividade, mas sim sua complementação, ou seja, o mercado de etanol deve ser suprido não apenas com a produção de uma única atividade, mas sim com expansão da matéria-prima, especialmente em períodos de entressafra, minimizando os riscos de que o país venha a sofrer com reajustes nos preços deste combustível (FERREIRA, 2015).

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma gramínea, originária do continente africano e pertencente à família Poaceae, sendo cultivada em muitas regiões do mundo. É o quinto cereal mais produzido no mundo, ficando atrás apenas do trigo, do arroz, do milho e da cevada. É uma espécie bastante versátil, com diversas utilizações no mercado agrícola. São cinco tipos diferentes, que podem ser utilizados como grãos (sorgo granífero); na confecção de silagem (sorgo forrageiro); na produção de biomassa lignocelulósica (sorgo biomassa); como vassoura (sorgo vassoura); e, para a produção de etanol (sorgo sacarino) (MAY, 2013).

É uma planta anual, com caule compostos por nós, entrenós ou intermódios, que sustentam as folhas e as inflorescências. A altura da planta é variável, dependendo dos genótipos, sendo que, em geral, plantas de sorgo sacarino apresentam altura elevada (2 a 4 metros) (MAY, 2013). A inflorescência é do tipo terminal (panícula), aberta, que produz grãos (sementes), ricos em amido, sendo o fruto uma cariopse ou grão seco (MAGALHÃES et al., 2010; DINIZ, 2010; FERREIRA, 2015).

O sorgo sacarino, assim como a cana-de-açúcar, apresenta colmos ricos em açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose), e dessa forma, possibilita também a produção de etanol na mesma instalação utilizada pela cana-de-açúcar (ALMODARES; HADI, 2009; DURÃES, 2011). No entanto, diferem em aspectos importantes, relacionados à implantação da cultura e ao ciclo vegetativo, sendo o sorgo sacarino cultivado a partir de sementes e com ciclo bem mais curto, de 120 a 130 dias (MAY et al., 2012), apresenta ainda alta produtividade de biomassa verde (60 a 80 ton.ha<sup>-1</sup> de biomassa com o Brix variando de 16 até 23%), além disso, a cultura é totalmente mecanizável, não exigindo insumos ou equipamentos especiais durante todo seu cultivo (FERREIRA, 2015).

É uma planta de dia curto, com metabolismo do grupo C4, ou seja, apresenta alta eficiência na utilização da radiação solar para conversão do CO<sub>2</sub> em fotoassimilados (MAY, 2013; PEREIRA FILHO et al., 2013), e a temperatura recomendada para cultivo varia entre 16 °C e 38 °C, conforme a cultivar (MAY et al., 2011). Além disso, apresenta tolerância ao alumínio tóxico do solo e ao déficit hídrico (MAY et al., 2012; PRASAD et al, 2007; ALMODARES; HADI, 2009), requerendo três vezes menos água que a cultura da cana-de-açúcar. Segundo Ferreira (2015), a resistência do sorgo sacarino à seca se deve ao fato de apresentar sistema radicular profundo, ramificado e extenso, o que possibilita a planta explorar maior volume de solo e ser eficiente na extração da água do solo. A presença de cerosidade nas folhas e colmos também favorecem a menor perda de água, além de atuar na regulação estomática.

O sorgo se adapta ainda a uma faixa de pH entre 5,0 – 8,5, tolerando também a salinidade e a alcalinidade (REEDY; REEDY, 2003). De acordo com Ferreira (2015), é esta rusticidade que permite que a cultura seja implantada em áreas de reforma de canaviais, entressafra dos mesmos e com boa adaptabilidade a

diferentes solos. Já para Coelho (2011), apesar da sua característica de rusticidade, o sorgo sacarino responde intensamente a maiores fornecimentos de água e adubação, alcançando ou podendo superar a produção de massa seca e de grãos obtidas pela cultura do milho. Apresenta ainda um ciclo de crescimento vegetativo quatro vezes menor que a cana-de-açúcar, permitindo de duas a três colheitas anuais de acordo com a região (REDDY et. al., 2005).

A profundidade de semeadura deve ser de aproximadamente 2 cm, utilizando-se cerca de 120.000 a 130.000 plantas/ha para cultivo no verão e 110.000 plantas/ha na safrinha (MAY et al., 2012). De acordo com os autores, o atraso na época de semeadura pode ocasionar perdas de produtividade (por ocasião de limitações de radiação solar no ciclo da cultura), além disso, destacam que a densidade populacional é fator importante a ser considerado no controle de doenças, pois quanto maior a quantidade de plantas por m<sup>2</sup>, maior a velocidade de dispersão do patógeno na área.

O monitoramento deve ser constante na lavoura para evitar o ataque de pragas e doenças. As principais pragas na lavoura de sorgo sacarino são as lagartas, pulgões e brocas, além das formigas. Já as doenças são antracnose (*Colletotrichum sublineolum*), helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) e cercosporiose (*Cercospora fusimaculans*) em final de ciclo, sendo importante observar a ocorrência de podridão das sementes nas fases iniciais de instalação da lavoura, que afetam a germinação e o desenvolvimento vegetativo da cultura (MAY, 2011b).

De forma complementar, o sorgo sacarino produz ainda grãos que podem ser utilizados na alimentação animal, possuindo características nutricionais semelhantes às do milho (DURÃES, 2011). Além disso, pode ser utilizado também num sistema de diversificação e rotação de culturas, e usado para consumo animal na forma de silagem, pastejo e na mistura de rações.

Garcia e Sutier (2016), ressaltam ainda que o fornecimento de sorgo sacarino para a indústria sucroenergética também pode ser proveniente de áreas tradicionalmente cultivadas com lavouras, por exemplo, da sucessão soja-milho safrinha, principalmente no estado do Mato Grosso do Sul. Neste caso, poderá ocorrer a substituição do milho safrinha pelo sorgo sacarino, possibilitando a diversificação de cultivos. De acordo com os autores, como o cultivo de soja mudou

nos últimos anos, com a colheita sendo realizada já nos meses de janeiro e fevereiro, o sorgo sacarino poderia ser implantado ainda em uma época favorável para a produção de biomassa, sendo possível a condução de rebrote até a próxima safra de soja, com incremento de resíduos na superfície e no perfil do solo, pelo sistema radicular abundante e agressivo do sorgo sacarino (FIETZ et al., 2013; BANDEIRA et al., 2012; SORDI, 2011; CALONEGO; ROSOLEM, 2010).

Klink (2010), afirma que, no estado do Rio Grande do Sul, 2 milhões de hectares dentro do zoneamento agrícola da cana-de-açúcar podem ser ocupadas com o sorgo sacarino. Contudo, apesar de existirem no mercado em torno de 15 cultivares de sorgo sacarino, as mesmas não apresentam indicação para o estado do Rio Grande do Sul, com exceção da cultivar BRS 506, de domínio público (EMBRAPA, 2012).

A cultivar BRS 506 foi lançada em 1987, juntamente com outras, sendo as primeiras com produção para etanol (PARRELLA, 2011). Em 2012, três novas cultivares foram lançadas, BRS 508, BRS 509 e BRS 511 (EMYGDIO et al., 2013). Enquanto novos híbridos sacarinos de alta qualidade não são disponibilizados ao mercado, as cultivares da Embrapa, especialmente as novas (BRS 508, BRS 509 e BRS 511) se constituem nas melhores opções de cultivo, segundo alguns estudos realizados recentemente (PARRELLA; SCHAFFERT, 2012). Conforme descrição da cultivar BRS 506, a mesma destaca-se pela versatilidade, resistência a estiagens, elevada qualidade de forragem e potencial de produção de massa verde, proporcionando silagem de boa qualidade com baixo custo de produção, além de apresentar insensibilidade ao fotoperiodismo.

Além disso, apresenta porte alto, ciclo de 120 a 130 dias, colmo com elevado teor de açúcares, boa produção de grãos e de silagem com alto padrão fermentativo. Seu potencial produtivo é de 1.500 kg/ha de grãos e 50 toneladas de colmo por hectare. Recomenda-se essa cultivar para as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste. Outras informações técnicas informam que a altura do pedúnculo é de 7cm, o endosperma é do tipo semiduro, a qualidade do suco é doce, o peso de 1000 grãos é 18 gramas, é resistente ao acamamento, rendimento de colmos é 40 a 60 t ha<sup>-1</sup>, rendimento de massa seca é de 15 a 20 t ha<sup>-1</sup>. Com relação as doenças, é moderadamente suscetível a antracnose (*Colletotrichum sublineolum*) e a ferrugem

(*Puccinia purpurea*), moderadamente resistente a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) (EMBRAPA, 2012).

Já a BRS 509, apresenta estabilidade de produção e teores elevados de açúcares fermentescíveis no caldo (média de 18° Brix), com ótimo padrão de fermentação, associados ao baixo custo de produção e alto potencial de produção de colmos (média de 60 t ha<sup>-1</sup>). Adaptada para a produção de biomassa em diversos sistemas de produção, apresentando porte alto (em torno de 3 metros), ciclo de 100 a 120 dias (ponto ideal para extração de caldo para a produção de etanol). Adicionalmente, a variedade BRS 509 apresenta outras características importantes, como a resistência ao acamamento e a alta sanidade foliar (PARRELLA et al., 2011). O florescimento é aos 70 a 75 dias e o ponto de colheita para extração de caldo aos 100-120 dias; altura de pedúnculo de 7 cm; panícula semicompacta; grão de coloração marrom; endosperma branco; semiduro; colmo suculento; peso de 1000 grãos de 18 gramas; rendimento de colmo de 60 a 80 t ha<sup>-1</sup>; rendimento de massa seca de 15 a 20 t ha<sup>-1</sup>. Com relação as doenças, a cultivar é moderadamente suscetível a antracnose (*Colletotrichum sublineolum*) e a ferrugem (*Puccinia purpurea*); moderadamente resistente a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*). Contudo, há a observação de que as reações dessa variedade às doenças estão sujeitas a mudanças, em função de possíveis alterações na predominância de raças de seus agentes causais. As regiões recomendadas para o cultivo são: Sul, Centro-Oeste e Sudeste.

A cultivar BRS 511 apresenta características semelhantes à cultivar BRS 509, contudo, difere nos teores de açúcares fermentescíveis no caldo sendo de 20° Brix de média; apresenta panícula semiaberta; qualidade do suco doce; peso de 1000 grãos de 24 gramas. É ainda moderadamente resistente a antracnose (*Colletotrichum sublineolum*); moderadamente suscetível a ferrugem (*Puccinia purpurea*) e moderadamente resistente a helmistosporiose (*Exserohilum turcicum*), podendo as reações serem modificadas devido a alterações na predominância de raças de seus agentes causais. Sendo também recomendando nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste (PARRELLA et al., 2011).

Para a cultivar Fepagro 19, poucos trabalhos e informações técnicas foram encontradas. Contudo, Brancão et al. (2002), identificou que em ensaio realizado em

Capão do Leão (2003/2004), esta cultivar apresentou resistência a antracnose, a helmintosporiose e a bacteriose, e resistência intermediária a ferrugem.

Araújo (2012), cita exemplos de produtividade de 2.429 litros de etanol por hectare com 39,18 toneladas de colmo/ha (62 litros de etanol por tonelada de colmo). De acordo com o autor, com os ajustes no manejo da cultura e adequações industriais, há potencial para produções acima de 3.500 litros de etanol/ha, com 50 toneladas de colmo por hectare e 70 litros de etanol por tonelada de colmo, sendo esta considerada uma produtividade referência para a cultura do sorgo sacarino. Segundo Franco (2015), a produtividade média de alguns híbridos do mercado já está entre 26 a 47 toneladas/ha, sendo o custo total de produção de aproximadamente R\$ 65 a R\$ 85 por tonelada, remetendo então a produção de etanol por hectare de até 3,9 mil litros/ha. Para este autor, a produtividade média tende a aumentar 30% a cada safra, resultante, principalmente, de manejo e conhecimentos aprimorados.

De acordo com Araújo (2012), os principais problemas enfrentados no cultivo do sorgo sacarino são: o desconhecimento da cultura do sorgo, incluindo ponto de colheita, fertilização e arranjo de plantas; despreparo das equipes operacionais e gerenciais; dificuldades para planejamento das operações; problemas para o controle de plantas daninhas; acamamento de até metade da área cultivada (conforme a cultivar usada) em função da altura elevada; e alto custo de transporte devido à baixa densidade de carga colhida. Para Faria (2013), a baixa produtividade é explicada pelas condições climáticas desfavoráveis, pelo uso de materiais genéticos com baixa qualidade e pelo manejo cultural inadequado. Araújo (2012) cita ainda que para aumentar a área, a produção e a produtividade do sorgo sacarino, é preciso que algumas necessidades sejam sanadas, tais como: uma evolução das cultivares de sorgo sacarino (panículas menores, maior resistência a pragas e a doenças, entre outros aspectos); o registro, junto ao governo, de defensivos agrícolas específicos para a cultura; a redução de custos de produção, juntamente com a elevação da produtividade; a adequação do arranjo de plantas para maiores produtividades; e o desenvolvimento da sementeira diretamente na palha da cana.

As contribuições dos setores público e privado, no oferecimento de cultivares adaptadas às condições de plantio e de alto potencial de produção têm possibilitado incrementos significativos na produtividade média nacional, com reflexos no

aumento da oferta de grãos, na competitividade e na geração de renda (RIBAS, 2008). Para Cunha e Severo Filho (2010), torna-se de grande interesse socioeconômico o desenvolvimento de pesquisas na área de produção do etanol a partir do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), para que o Rio Grande do Sul possa se inserir no contexto nacional de Estado produtor.

## 2.2 PRODUÇÃO E QUALIDADE DE SEMENTES DE SORGO SACARINO

Com o atual crescimento da cultura do sorgo sacarino como matéria prima alternativa na produção de etanol, aumentou também a demanda por sementes de alta qualidade. Segundo Nunes (2015), a produção de sementes sofre influência da interação genótipo-ambiente, sendo maximizada pela adequada escolha da época de semeadura. De acordo com Ferreira (2015), o período de maturação desta planta está diretamente relacionado à emissão da panícula, que contém as sementes. Nessa fase de maturação, os açúcares armazenados no colmo são translocados para os grãos e então armazenados na forma de amido (GOMES; RODRIGUES; OLIVEIRA, 2011).

Segundo Magalhães, Durães e Rodrigues (2008), as flores na panícula desenvolvem-se sucessivamente do topo para a base (4 a 5 dias). Como nem todas as plantas num campo de sorgo florescem ao mesmo tempo, a duração do florescimento no campo pode variar de 6 a 15 dias. O número de espiguetas por panícula varia de 1500 a 7000. A panícula do sorgo também pode variar muito quanto a forma e tamanho (compacta, aberta, grande, pequena). O grão de sorgo formado igualmente varia muito quanto a cor, dureza, forma e tamanho. A massa de 100 sementes varia de menos de 1 g a mais de 6 g, sendo assim, a desuniformidade de maturação irá ocorrer entre plantas dentro de uma população, assim como entre sementes dentro de uma mesma planta (MAGALHÃES; DURÃES; RODRIGUES, 2008).

A formação da panícula se dá de cima para baixo, e após 70 dias, o grão é considerado leitoso e já atingiu metade do peso. Assim, o ponto de maturidade fisiológica ocorre quando há máximo acúmulo de massa seca, mas de maneira desuniforme, sendo que nas sementes de sorgo sacarino, os maiores percentuais de

germinação e vigor são obtidos quando as sementes apresentam em torno de 30% de umidade (EMBRAPA, 2012; PARRELLA; PARRELLA, 2011).

Os mesmos autores relatam que as plantas são mantidas no campo até as sementes atingirem um teor de água de 18%, valor no qual os danos na colheita são menores. Nesta fase, o teor de água é importante para o posterior armazenamento e manutenção da qualidade fisiológica e sanitária das sementes.

De acordo com a Embrapa (2012), as melhores variedades de polinização aberta de sorgo sacarino são superiores em qualidade a determinados híbridos, contudo, devido ao porte alto (2 a 4 metros), a colheita mecânica das sementes é dificultada. Além disso, o excesso de grãos nas panículas, no ápice das plantas, tende a favorecer o acamamento, que é indesejável por reduzir a qualidade da matéria-prima devido ao maior teor de impurezas na colheita das plantas acamadas (PARRELLA; SCHAFFERT, 2012). Para os autores, este problema da produção de sementes poderá ser amenizado com plantios em épocas do ano com comprimento dia menor que 12 h (outono/inverno) e temperatura noturna superior a 15 °C. Nestas condições a planta tende a reduzir o porte possibilitando uma colheita mecanizada.

A colheita mecanizada das sementes, caso não esteja bem regulada, também pode causar danos às mesmas, os quais poderão servir de porta de entrada de diversos patógenos, reduzindo a qualidade sanitária e conseqüentemente, a qualidade física e fisiológica destas sementes.

### **2.2.1 Qualidade fisiológica de sementes de sorgo sacarino**

O estabelecimento de plântulas no campo é uma das principais características que o produtor observa na lavoura, e que pode significar qualidade de sementes adquiridas, estando diretamente relacionado com a germinação e vigor destas (PEREIRA et al., 2007). Dessa forma, entende-se que o sucesso de uma produção agrícola começa pela obtenção de sementes de qualidade, pois aquelas de procedência duvidosa poderão dar origem a plantas com produção abaixo de seu potencial genético (ALBUQUERQUE et al., 2009), mais suscetíveis aos ataques de microrganismos e produtos com qualidade inferior.

A porcentagem de germinação é a principal determinação levada em consideração quando é realizada a análise fisiológica de um lote de sementes,



sendo que, em teste de laboratório, essa porcentagem é definida como sendo a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 2009).

Já os testes de vigor buscam expressar a capacidade das sementes, principalmente com relação a germinação, de apresentar um desempenho adequado quando expostas a diferentes condições ambientais (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Estes testes permitem inferir conclusões sobre o comportamento das sementes no campo e tem relação direta com o armazenamento das mesmas, pois quanto mais baixo o vigor das sementes, mais baixo será o potencial de armazenamento, diminuindo assim, o período de comercialização das mesmas. O armazenamento inadequado poderá também favorecer o desenvolvimento de diversos patógenos que afetarão a qualidade fisiológica do lote.

De acordo com Peres (2010), o teste de envelhecimento permite que a taxa de deterioração das sementes seja consideravelmente aumentada, através da exposição das sementes a níveis muito adversos de temperatura e umidade relativa, os quais são considerados fatores ambientais preponderantes na intensidade e velocidade de deterioração. Assim, verifica-se que amostras com baixo vigor apresentam maior queda de sua viabilidade, quando submetidas a essa situação; portanto, as sementes mais vigorosas geralmente são menos afetadas em sua capacidade de produzir plântulas normais e apresentam germinação mais elevada, após serem submetidas ao envelhecimento.

Para Delouche e Baskin (1973), a sequência do processo de deterioração da semente envolve a degradação das membranas celulares, a redução das atividades respiratórias e biossintéticas, a menor velocidade na germinação, a redução no potencial de conservação durante o armazenamento, a menor taxa de crescimento e desenvolvimento, a menor uniformidade, a maior sensibilidade às adversidades do ambiente, a redução da emergência das plântulas no campo, o aumento da ocorrência das plântulas anormais e, finalmente, a perda do poder germinativo. Conseqüentemente, o teste de envelhecimento acelerado poderia ser considerado como um dos mais sensíveis para a avaliação do vigor dentre os disponíveis, pois se relaciona ao potencial de conservação das sementes (MARCOS FILHO, 1999).

Para Marcos Filho (1999) e Delouche e Baskin (1973) e o envelhecimento acelerado é um teste de vigor baseado na simulação de fatores ambientais adversos tais como altas temperaturas (40-45 °C) e umidade relativa elevada (100%), que são relacionados como causadores da deterioração das sementes.

Outro teste de vigor, que pode ser complementar ao teste de germinação, é o de comprimento de plântulas, que, segundo Milosevic et al. (2010), é adequado para as espécies que tem a plúmula ereta e individualizada, como as gramíneas. A uniformidade e velocidade de emergência das plântulas são componentes importantes do desempenho das sementes e afetam diretamente o estabelecimento do estande. Sementes vigorosas mobilizam reservas de tecidos de armazenamento para o eixo do embrião de forma mais eficiente e essa capacidade é refletida em crescimento das mudas (MARCOS FILHO, 2015); além disso, a germinação rápida geralmente corresponde a mais rápida emergência das plântulas em campo.

Os testes de massa seca e comprimento de plântulas são considerados, assim como o de velocidade de germinação, como testes que consideram que lotes que apresentam sementes mais vigorosas, originarão plântulas com maiores taxas de desenvolvimento e ganho de massa, pois apresentam maior capacidade de transformação dos tecidos e suprimento das reservas dos tecidos de armazenamento na composição e formação do eixo embrionário (AMARO, 2010; DAN et al., 1987; FRIGERI, 2007; PERES, 2010). Höfs et al. (2004) também concluíram que o vigor das sementes afeta o crescimento inicial das plântulas e a capacidade dessas em acumular biomassa, devido ao fato de que sementes com maior vigor originam plântulas com maior taxa de crescimento. Além disso, podem apresentar maior atividade enzimática e translocação de nutrientes, entre outros fatores (MARCOS FILHO, 2005).

Considerando também que a redução da germinação é a última consequência observada na perda de qualidade, os outros testes possíveis de serem realizados podem fornecer informações importantes do monitoramento dessa qualidade das sementes, a partir da maturidade, pois, de acordo com Dias e Marcos Filho (1995), a queda do vigor precede a perda de viabilidade.

### 2.2.2 Incidência de doenças na cultura e a qualidade sanitária das sementes de sorgo sacarino

A seleção de cultivares de sorgo sacarino leva em consideração a produtividade e qualidade da biomassa; conteúdo mínimo de açúcar total no caldo; produção mínima de etanol; período de utilização industrial, assim como a resistência às principais pragas e doenças – antracnose (*Colletotrichum sublineolum*), helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), ferrugem (*Puccinia purpurea*), cercosporiose (*Cercospora fusimaculans*) e míldio (*Peronosclerospora sorghi*) (PARRELLA; PARRELLA 2011). O uso de cultivares resistentes é a estratégia mais utilizada pelos produtores para o controle de doenças, contudo, a alta variabilidade dos patógenos faz com que novas cultivares sejam sempre lançadas (PINTO, 2006). Além disso, não há no mercado cultivares totalmente resistentes às doenças, o que faz da necessidade de disponibilidade de sementes de qualidade uma questão imprescindível para os ganhos de produtividade e rendimento desta cultura.

Mesmo o melhoramento priorizando a resistência a determinados patógenos, em lavouras mal conduzidas, o aparecimento das doenças pode ocorrer, afetando a produtividade, conforme o grau de infestação das plantas. Determinados patógenos podem ser transmitidos pelas sementes, sendo assim, a transmissão dos mesmos a novas áreas pode afetar consideravelmente a qualidade e a quantidade de etanol produzido (MAY, 2011b). Infestação por Fusariose, por exemplo, pode resultar em coloração avermelhada do caldo e do bagaço, após moagem, em razão da deposição de antocianina nos tecidos do colmo (MAY, 2011b). Segundo May (2013), a presença de *Puccinia purpurea* e *Macrophomina phaseolina* reduz o conteúdo de açúcares no colmo. Afirma ainda que a presença de algum tipo de microrganismo inesperado pode ser infeccioso para as leveduras, dificultando assim a reprodução das mesmas e conseqüentemente a conversão dos açúcares em etanol.

O controle de doenças é um ponto crucial na manutenção da qualidade da lavoura. Contudo, a infestação por determinados patógenos, como *Colletotrichum graminicola*, *Exserohilum turcicum* e *Cercospora fusimaculans*, ocorre mais tardiamente, quando não é mais possível a entrada de maquinário na área,

devido à altura elevada das plantas (MAY, 2011b), dessa forma, o controle é dificultado e a transmissão destes patógenos às sementes pode ocorrer facilmente.

Diversas doenças são comuns nos canaviais, causando prejuízos, contudo, há informações limitadas sobre identificação e transmissão de patógenos associados às sementes de sorgo sacarino, principalmente no Brasil, o que é de suma importância neste contexto de expansão da cultura.

O conhecimento dos patógenos que podem ser transmitidos via sementes é fundamental também para a cultura seguinte, visto que normalmente a cultura sucessora é a cana-de-açúcar e algumas doenças atingem as duas espécies concomitantemente (MAY, 2011b). Além disso, a correta identificação dos patógenos proporciona maior eficiência no controle das doenças.

Segundo Pinto (1999), a cultura do sorgo está sujeita à incidência de um grande número de doenças, muitas das quais podem ser limitantes à sua produção, dependendo das condições ambientais e da suscetibilidade da cultivar (COTA, 2014), cujos patógenos são, na maioria das vezes, transmitidos via semente. Essa transmissão via semente deve-se principalmente pela forma das suas panículas, nas quais as sementes estão totalmente agrupadas e expostas, criando condições ideais para o desenvolvimento de fungos, especialmente na época da maturidade fisiológica das sementes, onde a umidade relativa é mais elevada. O mesmo autor cita como os mais frequentes fungos associados às sementes: *Cladosporium* sp., *Alternaria tenuis*, *Drechslera turcica*, *D. sorghicola*, *Fusarium moniliforme*, *F. semitectum*, *F. subglutinans*, *Penicillium* sp., *Phoma sorghina*, *Aspergillus falvus*, *A. niger*, entre outros. Estes são responsáveis por perdas na qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos, e, no caso de causarem deterioração dos grãos, estes fungos podem descolori-los e degradar proteínas, açúcares e carboidratos.

Dentre as doenças que afetam a cultura, no Brasil, podem ser citadas como mais importantes as seguintes: antracnose (*Colletotrichum sublineolum*), míldio (*Peronosclerospora sorghi*), helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), ferrugem (*Puccinia purpurea*), ergot ou doença açucarada (*Claviceps africana*), podridão seca (*Macrophomina phaseolina*), podridão vermelha do colmo (*Fusarium moniliforme*), entre outros (COTA, 2014; COTA et al., 2010; EMBRAPA, 2011).

A podridão vermelha do colmo é comum em todas as regiões onde se cultiva o sorgo. A redução na produção e na qualidade de grãos e de forragem é atribuída a

ela por afetar o enchimento dos grãos e provocar o enfraquecimento do colmo, causando, geralmente, tombamento e/ou podridão do colmo. Este patógeno pode infectar as raízes, o colmo e o pedúnculo da planta, comprometendo a firmeza do tecido interno. O fungo pode causar, também, podridão de sementes e morte das plântulas, e pode ocasionar prejuízos quando a incidência do patógeno ocorrer próxima ao período do florescimento (COTA et al., 2010; PANIZZI; FERNANDES, 1997).

As doenças fúngicas transmitidas pelas sementes podem causar perdas tanto na produção de biomassa e etanol como na qualidade das sementes. As mesmas poderão apresentar redução na germinação, na emergência de plântulas e no vigor; os fungos podem ocasionar a morte das plântulas, após a sua emergência, ou interferirem no seu desenvolvimento (redução), o que acarretará na baixa população de plantas no campo (PINTO, 1999). Além disso, as sementes infectadas ou infestadas por fungos constituem fonte de inóculo para as doenças em condições de campo.

O fungo *Fusarium moniliforme*, por exemplo, pode, saprofiticamente, manter-se no tegumento remanescente das sementes, pois se trata de um fungo de solo, e sobreviver em restos culturais (SARTORI; REIS; CASA, 2004), além disso, este patógeno ataca outros hospedeiros, como arroz e cana-de-açúcar, tanto em zonas de climas temperados e tropicais (MARTÍNEZ-RAMÍREZ et al., 2005), podendo permanecer viável por mais tempo. Segundo os mesmos autores citados acima, apesar de ser um fungo que não apresenta estruturas de sobrevivência, como escleródios ou hifas de paredes espessas, ele pode resistir a condições ambientais muito adversas e persistir por seis meses em colmos de sorgo. Isso mostra que os resíduos são uma importante fonte de inóculo a longo prazo, especialmente para infecções de colmo e raiz. Porém, a taxa de transmissão, por exemplo, de *F. moniliforme*, mesmo com as sementes apresentando altas incidências deste fungo, ainda não foi quantificada em sementes de sorgo (SARTORI; REIS; CASA, 2004).

Diferentes patógenos podem atacar todas as partes das plantas (MAY, 2013), como colmo, raízes, panículas e folhas, levando à redução da área foliar fotossintetizante, podridão e danos aos colmos, seca precoce e acamamento. O mesmo autor relata ainda que algumas doenças podem causar redução na quantidade de açúcares no colmo.

Durante o subperíodo semeadura-emergência, o desenvolvimento das plantas de sorgo pode ser limitado, afetando assim o primeiro componente do rendimento de grãos, o número de plantas por unidade de área. Sementes com presença de patógenos podem causar redução nesse número de plantas, seja impedindo a germinação das mesmas ou causando tombamento posteriormente. Já o ataque de alguma doença na fase de diferenciação da panícula, afetará o número potencial de óvulos (futuramente grãos) nas inflorescências que estão sendo definidas, assim, poderá ocorrer redução na quantidade de sementes produzidas e até mesmo a infecção das sementes por este patógeno (EMBRAPA, 2013).

Nas semeaduras tardias (dezembro-janeiro), além do encurtamento do ciclo, constata-se geralmente maior acamamento de plantas e maior incidência de pragas e de doenças, especialmente as de colmo e de folhas. Por estarem mais sujeitas ao ataque de doenças no colmo, as plantas tornam-se mais suscetíveis ao acamamento nessas épocas (EMBRAPA, 2013). O acamamento também permite o contato da panícula com o solo, ou com outras partes da planta. Esse contato pode proporcionar um ambiente de maior umidade e favorecer o desenvolvimento dos patógenos, até mesmo daqueles considerados de armazenamento (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., entre outros), pois após a maturação as sementes já se encontram em armazenamento, mesmo estando no campo.

Segundo Vendruscolo et al. (2016), as sementes de sorgo que são destinadas à comercialização geralmente não são submetidas à análise de sanidade para detecção dos microrganismos que as infectam, podendo assim disseminar novos patógenos em áreas isentas, causando sérias epidemias nas lavouras.

Muitas dessas doenças que atacam a cultura do sorgo sacarino são as mesmas que infectam os outros tipos de sorgo (grão, pastejo e silageiro). Dessa forma, sabe-se que a ocorrência e severidades de algumas doenças dependem da quantidade de inóculo do patógeno na área de cultivo, das condições ambientais e da suscetibilidade de cada cultivar (MAY, 2013).

O desenvolvimento e a produção de uma espécie vegetal dependem do genótipo e das condições ambientais, assim, fatores associados ao clima (umidade, temperatura, luz, vento), ao solo (nutrientes, pH) e ao cultivo podem ser responsáveis pela predisposição das plantas ao ataque de patógenos. Como consequência, o desenvolvimento vegetativo e produtivo destas plantas é

prejudicado. Como na cultura do sorgo sacarino todas as partes da planta (colmos, grãos e parte aérea) podem ser utilizados na produção de biocombustível (EMBRAPA, 2013), o ataque de determinadas doenças pode afetar qualitativamente e quantitativamente a produção.

### 2.2.2.1 Transmissão e identificação genética de patógenos

Os organismos fitopatogênicos, de uma forma geral, podem ser transportados pelas sementes, podendo estar localizados no interior dos tecidos, na superfície ou aderidos à semente (MUNIZ; PORTO, 1999). Aqueles patógenos localizados internamente, apresentam chances maiores de serem transmitidos às plântulas, porém, se a contaminação for superficial, os danos poderão ser maiores nas fases iniciais do processo de germinação (NEERGAARD, 1979). Além da localização do fungo na semente, a quantidade e o tipo de inóculo (micélio, esporos, etc.), e fatores como umidade e temperatura também influenciam na capacidade de transmissão (MACHADO; CASSETARI NETO; GUERRA, 2005). Se a transmissão do patógeno pela semente for eficiente, a planta desenvolverá a doença, o que poderá acarretar em problemas na plântula, inclusive sua morte.

Sachs et al. (2012) constataram a transmissão de *Fusarium verticillioides*, causador da podridão de sementes, raízes, colmo e espiga em milho, mesmo após tratamento de sementes. A transmissão de *Fusarium moniliforme*, de sementes de milho para a plântula também foi confirmada por Sartori, Reis e Casa (2004). Balardin et al. (2005) verificaram a transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão-vermelha da raiz de soja, através de sementes dessa cultura. Garcia Júnior (2006) constatou a transmissão de *Fusarium graminearum*, via sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.), para diferentes partes da plântula (raiz, colo e haste). Kelly et al. (2011), identificaram *Fusarium thapsinum*, transmissor e causador das podridões de colmo, como uma espécie dominante em todas as plantas amostradas de sorgo, e em todas as regiões pesquisadas da Austrália. Melo (2014), também constatou que isolados de *F. thapsinum* induziram sintomas de podridão em colmos de milho, sorgo e milheto, além de sintomas como escurecimento no interior do colmo de todas as plantas e colonização dos dutos vasculares no seu interior.

A determinação de fungos associados às sementes e transmitidos para as plântulas é fundamental para a definição de algumas estratégias de controle, pois se define, por exemplo, se o inóculo causador da doença chegou até a área através da transmissão eficiente pela semente ou de outra forma (CASA; REIS; MOREIRA, 2005).

Neste contexto de correta identificação dos patógenos associados à semente, a biologia molecular é uma ferramenta importante na identificação destas espécies fúngicas. Estudos recentes vêm aplicando diferentes técnicas moleculares, de acordo com cada patógeno, as quais podem auxiliar na identificação de microrganismos por meio de suas diferenças genéticas (LIMA et al., 2010).

O uso de técnicas moleculares, através da análise de DNA, possui a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível. Essas técnicas não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (MENEZES et al., 2010). As técnicas conhecidas de diagnóstico molecular fundamentam-se na análise direta ou indireta da composição ou na sequência dos ácidos nucleicos para identificação e caracterização de organismos.

Segundo Magnani et al. (2005), a análise do DNA facilita a caracterização e a diagnose rápida de patógenos, com uma sensibilidade e especificidade maior que a identificação por taxonomia clássica. Além disso, são capazes de diferenciar, de forma eficiente as espécies, *formae speciales*, raças e isolados (KUMARAE; SOUZA, 2002), por serem capazes de determinar a diversidade (polimorfismo) existente entre as sequências de nucleotídeos dos organismos (MENEZES et al., 2010).

A análise filogenética de caracteres de ácidos nucleicos é uma das melhores opções para a identificação fúngica, porque, uma vez que as espécies descendentes se formaram a partir de um ancestral comum, as mudanças nas sequências genéticas podem ser reconhecidas antes mesmo que as mudanças na morfologia e na reprodução (TAYLOR et al., 2000).

O conhecimento dessa variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da doença (LAZAROTTO, 2013), isso porque, após a identificação das espécies, e conhecimento da agressividade do patógeno, maiores poderão ser as



perdas na lavoura e os gastos com aplicação de fungicidas, e, com isso, as pesquisas com melhoramento genético deverão ser mais intensas.

Uma das técnicas moleculares amplamente utilizadas para a identificação de fungos é a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), a qual permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA de células fúngicas, vivas ou mortas, mesmo que estejam misturadas a outros DNAs (PINHEIRO, 2004). Os métodos com base em PCR abrem a possibilidade de utilizar essas técnicas de maneira rápida, segura e reproduzível, para identificação e controle de qualidade de coleções de fungos (NOVAIS et al., 2010). A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada como um método de diagnóstico, uma vez que permite a detecção mesmo com quantidades muito pequenas de DNA (SOUZA, 2013).

Segundo Haegi et al. (2013), como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de sequências de nucleotídeos-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas. Sequências de DNA de determinados microrganismos podem ser amplificadas, utilizando *primers* (sequências iniciadoras) complementares àquelas localizadas em locais específicos do genoma. A partir daí o DNA é desnaturado e o *primer* anelado, ocorre então a extensão do fragmento do DNA, a partir destes *primers*, com a ajuda de uma DNA polimerase termoestável, a *Taq* DNA polimerase, sendo o ciclo desnaturação-anelamento-extensão repetido várias vezes, possibilitando a amplificação exponencial daquela sequência específica (REIS JUNIOR et al., 2002).

Diferentes regiões do DNA podem ser utilizadas para identificação, tais como Internal Transcribed Spacer (ITS),  $\beta$ -*tubulina*, fator de alongação 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), RNA polimerase II (RPB2), *calmodulina*, *elicítina*, *glutamina sintetase*, *actina*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, região intergênica (IGS), região genômica característica (Sequence Characterised Amplified Regions – SCAR), entre outras. Para Oliveira et al. (2011), todas elas apresentam vantagens e desvantagens em relação ao seu uso, seja pela dimensão dos fragmentos amplificados, pela facilidade de amplificação, pela utilização de *primers* universais, ou pela variação ao nível das sequências, intra e interespecies.

Gonçalves et al. (2011), aplicando a técnica de PCR e amplificando a região ITS do rDNA, identificou que nas lesões necróticas em folhas de plantas de milho

estavam presentes fungos como *Fusarium chlamydosporum*, *F. equiseti*, *Alternaria alternata*, *A. ricini*, entre outros. Walker et al. (2016), avaliando a patogenicidade de *Fusarium* spp. associado às sementes de guajuvira, identificou molecularmente as espécies de *F. acuminatum* e *F. verticillioides*, sequenciando a região ITS e o gene do fator de alongação 1- $\alpha$ .

A região mais utilizada na identificação molecular de fungos é a denominada “Internal Transcribed Spacer” (ITS), que faz parte do gene do RNA ribossômico. Esses genes possuem sequências mais conservadas filogeneticamente e, por isso, são mais adequados para os estudos de biodiversidade e identificação de espécies fúngicas (REIS JUNIOR et al., 2006; SANTOS, 2013). Além disso, as regiões ITS são consideradas relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecem em grande número de cópias no genoma, permitindo assim que sejam facilmente amplificadas e sequenciadas (FUNGARO, 2000; MARTINS, 2005). Como consequência, tem-se o grande número de sequência ITS de diferentes fungos disponíveis nos bancos de dados de sequência de nucleotídeos. A utilização de programas computacionais, que permitam a comparação destas sequências de organismos, permite definir regiões apropriadas para a síntese de *primers* utilizados para detectar uma determinada espécie de fungo (MARTINS, 2005).

As regiões ITS dispõem de características interessantes para a identificação dos fungos em nível molecular. Uma delas é que, nos fungos, esta região, que corresponde aos genes 18S e 28S, é amplificada, utilizando *primers* universais e específicos, os quais são ancorados nestas duas regiões (LARENA et al., 1999; BARROCAS, 2008). Outra característica importante deve-se à natureza repetitiva do rDNA, que torna esta região fácil de amplificar a partir de amostras pequenas, diluídas e altamente degradadas, sendo mais de 100 cópias por genoma de fungos (OLIVEIRA et al., 2010).

Como o genoma do fungo contém muitas cópias idênticas do rDNA, então, essa região constitui um ótimo alvo para os programas de detecção molecular (BARROCAS, 2008). Quando houver grande diferença taxonômica dentro de espécies de um fungo e existirem outras espécies relacionadas, a região genômica frequentemente escolhida para estudos filogenéticos é o rDNA e, particularmente, o ITS devido à grande quantidade de sequências disponíveis (GLYNN et al., 2005).

A razão da escolha da região ITS para identificação de fungos está no fato desta ser menos suscetível à pressão de seleção e, por isso, ter acumulado maior porcentagem de mutação que as outras regiões do DNA (COUTINHO et al., 1999).

Contudo, em alguns trabalhos, a codificação da região ITS não tem sido eficaz para a determinação de algumas espécies de *Fusarium* sp. devido a presença de duas cópias não homólogas dentro da região ITS2, causando divergência nos resultados (WAALWIJK et al., 1996). O'Donnell et al. (1998) não obtiveram êxito para alguns isolados de *Fusarium* sp., pertencentes ao complexo *Gibberella fujikuroi* com a região ITS, no entanto, a região da  $\beta$ -*tubulina* foi eficiente para a diferenciação das espécies. Maciel (2012), também sequenciando a região ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) não conseguiu definir, de forma conclusiva, a espécie do isolado de *Fusarium* spp.

Estudos filogenéticos realizados com *Fusarium* spp. apontaram que a região do fator de alongação  $1-\alpha$  pode ser utilizada como uma ferramenta adequada para distinguir espécies do fungo, possuindo correlação com 16 taxas de *Fusarium* com capacidade micotoxigênica (O'DONNELL et al., 2000; KRISTENSEN et al., 2005). De acordo com Geiser et al. (2004), o gene que codifica o fator de alongação  $1-\alpha$ , tornou-se o marcador mais usual, visto que é um gene de cópia única, altamente informativo entre espécies relacionadas e presente em todas as fases de desenvolvimento do fungo. Para Maciel (2012), a árvore filogenética confeccionada com a sequência da região do fator de alongação  $1-\alpha$  apresentou valores de *bootstrap* confiáveis (89%) com dois acessos da espécie *Fusarium sambucinum* e com um acesso de sua fase sexuada *Gibberella pulicaris*, além de elevados percentuais de cobertura e similaridade, que aumentam a confiabilidade do alinhamento.

A região do fator de alongação  $1-\alpha$  em eucariotos, é altamente conservada e, por isso, muito utilizada nas análises de filogenia em fungos (GENTILE et al., 2005; MOON et al., 2004). Além disso, devido à conservação nucleotídica, há baixa taxa de mutação dos nucleotídeos nas sequências, permitindo assim a identificação de variações intraespecíficas (OKI; O'DONNELL, 2000; VAN'T KLOOSTER et al., 2000).

Divakara et al. (2013), procurando identificar e caracterizar molecularmente isolados de *Fusarium* spp., associados às sementes de sorgo, utilizaram as técnicas de amplificação do gene EF1 $\alpha$ , sendo que as análises filogenéticas foram realizadas

usando as sequências parciais de EF1 $\alpha$  e marcadores ISSR (*Inter Single Sequence Repeats* – sequências simples repetidas). O resultado revelou a presença de *F. verticillioides*, *F. thapsinum* e o complexo *F. incarnatum-equiseti*.

O uso das ferramentas moleculares representa um grande avanço na diagnose de patógenos transmitidos por sementes. A detecção precisa e rápida de fungos e de outros microrganismos patogênicos, em sementes de plantas cultivadas, é de extrema relevância, considerando-se que o controle de importantes doenças pode ser alcançado com sucesso por meio do manejo sanitário preventivo, em que o uso de sementes sadias é uma alternativa eficaz e de custo relativamente baixo (BARROCAS, 2008).

#### 2.2.2.2 *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium* pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, Subdivisão Pezizomycontina, Classe Sordariomycetes, Sub-classe Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales e Família Nectriaceae, possuindo aproximadamente 1485 identificações, entre espécies, raças e forma especiales descritas na literatura (INDEX FUNGORUM, 2017).

As espécies do gênero *Fusarium* apresentam um alto grau de diversidade, tanto nos aspectos morfológicos, fisiológicos e ecológicos, ocorrendo assim nas mais diversas regiões do mundo. Podem colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios, podendo ser disseminados pelo ar e pela água, e sobreviver também por longos períodos no solo pelos seus clamidósporos (MILANESI, 2009). Além disso incluem importantes fitopatógenos, causadores de murchas, podridões, morte de plântulas, aborto de flores, podridões de armazenamento e outras doenças. Segundo Michereff et al. (2005), algumas espécies deste gênero podem atacar sementes, e, ocorrendo isso na maturação dos grãos, colheita ou armazenamento, pode causar podridão de sementes ou aumentar essa incidência após o plantio.

A contaminação da semente poderá ocasionar graves problemas, levando o inóculo para áreas isentas e infectando o solo ou o substrato. Cabe ressaltar que este gênero é saprófita, o que poderá acarretar a deterioração e o apodrecimento das sementes, resultando em baixa na germinação e patogenicidade nas plântulas.

Espécies de *Fusarium* são associadas a doenças de grande importância econômica, por exemplo: *Fusarium solani*, causador da podridão em *Citrus* sp.; *F. tucumaniae*, *F. brasiliense* e *F. virguliforme* responsáveis pela podridão vermelha da raiz da soja; *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* causador da podridão radicular seca do feijoeiro; *Fusarium oxysporum* f.sp. *glycines*, causador da mancha de fusário em soja, entre outros. Segundo Melo (2014), *Fusarium* é o terceiro gênero de fungos com maior número de espécies que podem causar doenças em plantas, humanos e animais domésticos, produzindo ainda uma ampla gama de toxinas e metabólitos secundários (LESLIE et al., 2005).

Algumas espécies do gênero *Fusarium* faziam parte de um grupo denominado “*Gibberella fujikuroi species complex*”, que corresponde em grande parte a antiga seção *Liseola* (MELO, 2014). Atualmente este grupo passou a ser chamado de *Fusarium fujikuroi species complex* (GEISER et al., 2013), mudanças estas baseadas em dados químicos, biológicos, moleculares e características de patogenicidade, compreendendo mais de 60 espécies biológicas (MELO, 2014). Dentro deste complexo, há importantes patógenos relacionados a diversas culturas de importância econômica, tais como: *Fusarium sacchari* causando doença em cana-de-açúcar; *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum* associados à podridão de colmo e espiga em sorgo, milho e milheto (LESLIE et al., 2005; MELO, 2014), entre outros.

*Fusarium thapsinum* (fase sexuada *Gibberella thapsina*), sobrevive em gramíneas como endófitos, mas também pode representar uma ameaça para as gramíneas cultivadas pois mantém um reservatório de inóculo na vegetação natural (MELO, 2014). Este patógeno foi encontrado em cana-de-açúcar, causando a doença conhecida como “pokkah boeng”, também chamada de fusariose. De acordo com a autora, as plantas com sintomas desta doença apresentam deformação no topo, devido a atuação do fungo na região meristemática, sendo que alguns trabalhos remetem esta doença ao patógeno *F. sacchari*. Contudo, embora o Brasil seja um dos maiores produtores de cana-de-açúcar, a ocorrência de *F. sacchari*, como agente de “pokkah boeng” ainda não foi relatado (MELO, 2014). Segundo a mesma, na literatura brasileira esta doença também é encontrada com agente causal sendo *F. moniliforme*. Além disso, *F. thapsinum* era considerado uma população distinta dentro de *F. moniliforme*, e só mais tarde considerado uma

espécie (KLITTICH et al., 1997). Cabe ressaltar que esta espécie de *Fusarium* pode ser encontrada em diversas culturas agrícolas, entre elas cana-de-açúcar e sorgo.

Segundo Martínez-Ramírez et al. (2005), a presença de *Fusarium moniliforme* na cultura do sorgo, na região de Ciénega de Chapala, no México, chega a ocasionar perdas superiores a 50% na produção, quando agente causal da ferrugem da panícula. De acordo com o autor, a incidência de grãos infectados no sorgo, também causado por *F. moniliforme*, é aumentada quando as panículas são atacadas por insetos.

Para Melo (2011), *Fusarium moniliforme* (sin.: *F. verticillioides*) é um fungo que se comporta como endófito não somente em grãos, mais também em folhas, caule e raízes. Em variedades suscetíveis e tecidos com sintomas o autor observou o início da separação da lamela média das células atacadas, seguido de colonização intracelular e formação de papilas na parede da célula. Em estágio avançado de colonização foi observada destruição da integridade das organelas do hospedeiro, seguido da ausência da integridade da membrana citoplasmática e presença de citoplasma granulado. Contudo, a proporção de infecções assintomáticas em grãos pode ser em função do genótipo e do hospedeiro.

Os sintomas da doença são evidenciados, normalmente, após o florescimento das plantas. Estas secam prematuramente e, podem ou não tombar. Internamente, os tecidos do colmo e do pedúnculo infeccionados adquirem uma coloração avermelhada, que progride de forma uniforme e continua do ponto inicial da infecção em direção à parte superior da planta (COTA et al., 2010; PANIZZI; FERNANDES, 1997). Os grãos produzidos e infectados são menores, podendo também ocorrer podridão das sementes e morte de plântulas (PANIZZI; FERNANDES, 1997).

Para Maciel (2016), o gênero *Fusarium* caracteriza-se também por rápida disseminação e capacidade de disseminação, causando grandes perdas nas diferentes culturas que ataca, sendo a semente um dos principais vetores de disseminação das doenças. A identificação dos patógenos, em nível de espécie, é fundamental para direcionar quais serão as alternativas de controle adotadas. Devido à característica cosmopolita e de fácil proliferação de *Fusarium* sp., técnicas que eliminem ou minimizem o inóculo presente na semente são fundamentais.

Segundo Divakara et al. (2013), várias espécies de *Fusarium* já foram relatadas por infectar o sorgo e causar doenças como a podridão da raiz, morte de

plântula, colmo e de grãos mofados. As principais associadas com sorgo foram *Fusarium verticillioides*, *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* e *F. sachhari*, que produzem micotoxinas como as fumonisinas, moniliformina e fusaproliferina.

Dessa forma, tem-se que a variação genética observada dentro e entre populações de *Fusarium* spp., pode indicar a velocidade a que um agente patogênico evolui. Sendo assim, as informações sobre a viabilidade genética em populações de patógenos são importantes para desenvolver estratégias e medidas de controle mais eficientes, tais como aplicação correta de fungicidas e tratamentos de sementes (MAGCULIA, CUMAGUN; 2011).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ORIGEM DAS SEMENTES E LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório Didático e de Pesquisas em Sementes (LDPS), do Departamento de Fitotecnia, e no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, do Departamento de Defesa Fitossanitária, ambos do Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria/RS. Já para as identificações moleculares, os isolados foram encaminhados ao Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico de São Paulo para a realização do sequenciamento genético.

Foram avaliadas quatro cultivares de sorgo sacarino, sendo todas as sementes adquiridas sem qualquer tipo de tratamento fitossanitário, sendo elas: cultivar BRS 506; cultivar BRS 509, cultivar BRS 511, ambas obtidas da Embrapa, e a cultivar Fepagro 19, advindas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro).

As sementes utilizadas foram provenientes da safra 2013/2014 e produzidas na área experimental do Departamento de Fitotecnia, da UFSM (29°43'28"S, 53°43'18"W, altitude 95m). O solo da área é uma transição entre Argissolo Bruno-Acinzentado alítico úmbrico e Argissolo Vermelho distrófico arênico. O clima da região, segundo a classificação de KÖEPPEN, é do tipo Cfa, subtropical úmido, sem estação seca definida, com verões quentes (HELDWEIN; BURIOL; STRECK, 2009). Os tratamentos culturais como preparo do solo, correção e adubação foram realizados conforme recomendação técnica para a cultura e de acordo com a interpretação da análise de solo.

A semeadura para as quatro cultivares (BRS 506, BRS 509, BRS 511 e Fepagro 19) foi realizada em 16 de outubro, 15 de novembro e 16 de dezembro de 2013.

As panículas foram colhidas manualmente e colocadas em estufa com circulação forçada regulada a 45 °C, até a obtenção de umidade de 12%. A seguir, as panículas foram debulhadas, as sementes ventiladas para a retirada de impurezas e posteriormente homogeneizadas com peneiras e colocadas em sacos de papel Kraft, devidamente identificadas, e armazenadas no Laboratório de



Análises de Sementes (na própria instituição), em câmara fria, com temperatura de 12 °C e variação de 1 a 2 °C, até a realização das análises (aproximadamente três meses).

Logo após o armazenamento, as sementes foram submetidas à caracterização inicial, através das seguintes determinações e testes:

## 3.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FÍSICA E FISIOLÓGICA

### 3.2.1 Teor de água

O teor de água foi determinado pelo método de estufa de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), sendo utilizadas quatro subamostras de cinco gramas de peso úmido de sementes, e colocadas em estufa à temperatura constante de  $105 \pm 3$  °C. Após um período de 24 horas, as subamostras foram novamente pesadas. O resultado final foi expresso em porcentagem.

### 3.2.2 Teste de Germinação

Foram utilizadas 400 sementes, distribuídas em quatro repetições de 100. O teste foi realizado em rolo de papel umedecido com água destilada e esterilizada, equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco, sendo os rolos mantidos em germinador (25 °C), com fotoperíodo de 12 horas (BRASIL, 2009). A contagem foi realizada no décimo dia após a sementeira, segundo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, avaliando-se também a porcentagem de plântulas anormais e sementes mortas.

### 3.2.3 Comprimento de plântulas na germinação

Foi avaliado o comprimento médio de dez plântulas normais, escolhidas aleatoriamente, e obtidas do teste de germinação, realizado de acordo com as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Com auxílio de uma régua graduada em milímetros, foram mensurados o comprimento da parte aérea (a partir

da inserção do hipocótilo), comprimento radicular e o comprimento total das plântulas. O comprimento médio foi obtido então a partir da soma das medidas das plântulas, dentro de cada repetição, dividindo-se pelo número de plântulas normais mensuradas, sendo os resultados expressos em centímetros/plântula, conforme descrito por Nakagawa (1999).

### **3.2.4 Massa seca de plântulas na germinação**

As dez plântulas normais de cada repetição, obtidas da avaliação da germinação e que foram mensuradas, conforme descrito na avaliação de comprimento de plântulas, foram também utilizadas na secagem. Para a determinação da massa seca, as plântulas foram acondicionadas em sacos de papel, devidamente identificados, e posteriormente colocados em estufa a 70 °C, por 48 horas. A pesagem foi realizada em balança de precisão de 0,001 mg, sendo os resultados expressos em mg/plântulas (NAKAGAWA, 1999).

### **3.2.5 Emergência de plântulas**

Foram semeadas em bandejas plásticas com substrato de areia previamente lavada, esterilizada e peneirada, 100 sementes em sulcos de 1cm de profundidade, espaçados de 5 cm, divididas em quatro repetições, para cada cultivar. As irrigações ocorreram diariamente, e a avaliação ocorreu aos 15 dias após semeadura, quando a emergência das plântulas tornou-se constante, computando-se a porcentagem de plântulas emergidas (NAKAGAWA, 1999).

### **3.2.6 Índice de velocidade de emergência (IVE)**

Realizado conjuntamente com o teste de emergência, no qual foram realizadas contagens diárias das plântulas emergidas até a estabilização da emergência. Para cada repetição, a seguinte fórmula (MAGUIRE, 1962) foi aplicada:

$$IVE = E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn$$

Onde:

IVE = índice de velocidade de emergência;

E1, E2, En = número de plântulas emergidas, computadas na primeira, na segunda e na última contagem;

N1, N2, Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagem.

### **3.2.7 Comprimento de plântula na emergência**

Esta avaliação também foi realizada conjuntamente com o teste de emergência. De cada repetição foi mensurada, com auxílio de uma régua graduada em milímetros, a parte aérea de dez plântulas ao final do teste. Os valores obtidos das dez plântulas foram somados e divididos para se obter a média da repetição. Os resultados finais foram expressos em centímetros, conforme descrito por Nakagawa (1999).

### **3.2.8 Massa seca de plântulas na emergência**

As dez plântulas mensuradas no teste anterior (parte aérea) foram acondicionadas em sacos de papel e colocados em estufa, a 70 °C, por 48 horas. Foram então pesadas em balança com precisão de 0,001 mg e os resultados expressos em mg/plântula (NAKAGAWA, 1999).

### **3.2.9 Envelhecimento acelerado**

O teste foi conduzido em caixas tipo “gerbox”, nas quais foram adicionados 40 ml de água destilada. As mesmas possuem em seu interior uma bandeja com tela de alumínio onde as sementes foram distribuídas de maneira uniforme, impossibilitando o contato com a água. As caixas permaneceram em incubadora por um período de 48 horas, a 42 °C. Após este período, as sementes foram colocadas para germinar (conforme metodologia descrita anteriormente para o teste de germinação), em

quatro repetições de 100 sementes para cada tratamento, computando-se a porcentagem de plântulas normais, por repetição, ao final do quarto dia (MARCOS FILHO; CICERO; SILVA, 1987).

### 3.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SANITÁRIA

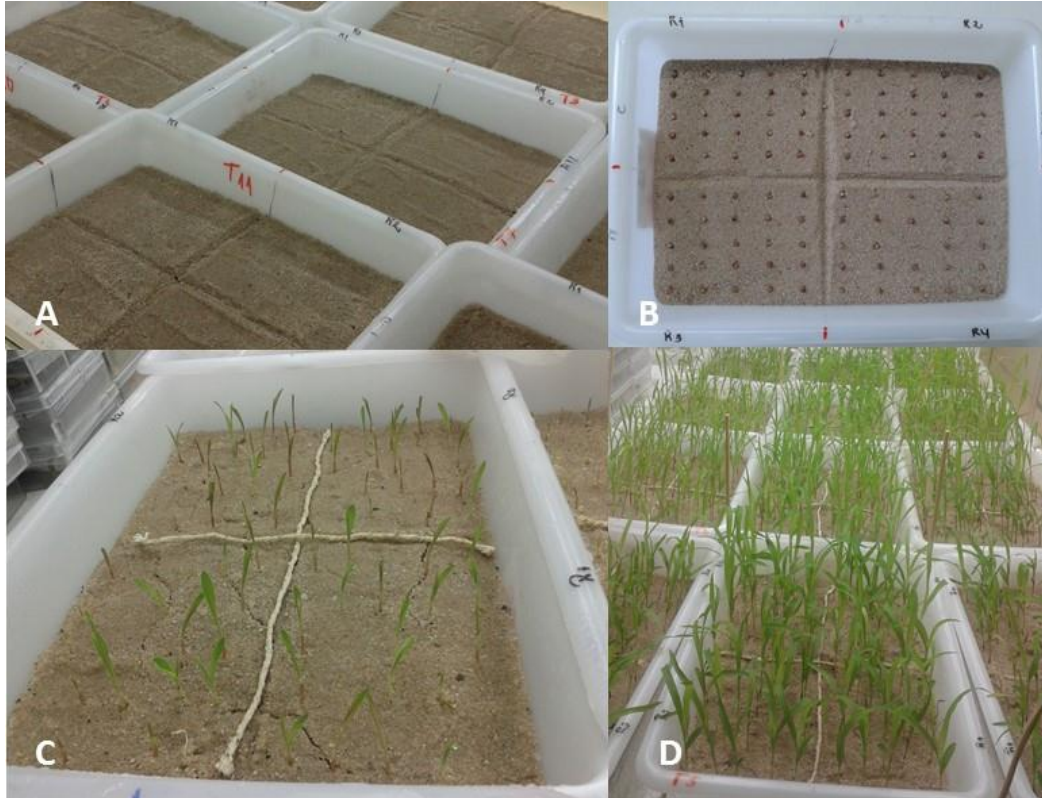
#### 3.3.1 Teste de sanidade

Realizado através do método do papel filtro ou "Blotter Test". Foram utilizadas 200 sementes, divididas em quatro repetições de 50 e colocadas em caixas plásticas do tipo "gerbox", previamente desinfestadas com álcool (70 %) e hipoclorito (1 %), sobre duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada e esterilizada. As sementes foram incubadas a temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas, durante 24 horas. Em seguida, submetidas ao congelamento por 24 horas, para inibir a germinação das sementes. Após esse período, foram novamente incubadas, por sete dias, a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com 12 horas de regime de luz, conforme metodologia proposta por Brasil (2009). As análises foram realizadas com o auxílio de lupa e microscópio óptico para observação das estruturas morfológicas dos fungos, os quais foram identificados em nível de gênero, com auxílio de bibliografia especializada de Barnett e Hunter (1998), e os valores expressos em porcentagem de sementes infestadas pelos gêneros fúngicos identificados.

#### 3.3.2 Transmissão de patógenos sem inoculação

Para este teste, a areia foi utilizada como substrato na condução do experimento, sendo peneirada e posteriormente esterilizada ( $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 1 atm, durante uma hora), conforme as Regras para Análise de Sementes (2009). Após este procedimento, para cada uma das cultivares foram semeadas 100 sementes, não desinfestadas, divididas em quatro repetições de 25, e distribuídas em bandejas com o substrato, como pode ser observado na figura abaixo (Figura 1). Não houve incorporação de inóculo de patógeno, a fim de que se verificasse a transmissão de patógenos via semente.

Figura 1 – Instalação e condução do teste de transmissão de patógenos sem inoculação via semente de sorgo sacarino.



Legenda: (A) areia esterilizada em bandejas; (B) sementes de sorgo sacarino semeadas nas bandejas; (C) emergência de plântulas de sorgo sacarino, e (D) plântulas emergidas após finalização do teste de transmissão. Fonte: autora.

As bandejas foram mantidas em câmara de incubação, a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, com irrigação diária. As avaliações foram realizadas no final de 20 dias, nas quais foram observadas a emergência de plântulas saudáveis e de plântulas com sintomas de doença. Os sintomas observados e registrados foram tombamento, murcha, coloração escurecida do hipocótilo, apodrecimento de sementes, plântulas mortas. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais e plântulas com sintomas.

### 3.3.3 Patogenicidade

#### 3.3.3.1 Isolamento de fungos

Os principais fungos identificados na avaliação da qualidade sanitária, em porcentagem significativa, e àqueles transmitidos via semente, observados no teste de transmissão, foram isolados das sementes e das plântulas e mantidos em placa de petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e antibiótico sulfato de estreptomicina (quantidades descritas no Anexo A), para prevenir a contaminação por bactérias.

Neste caso, somente para o fungo *Fusarium* sp., foi realizada a patogenicidade, por ter ocorrido em todas as cultivares e ter sido transmitido às sementes.

Para garantir a pureza dos fungos isolados, foi aplicada a técnica de cultura monospórica (FERNANDES, 1993). Uma pequena porção do micélio do fungo, cultivado em meio BDA, foi colocada em 5 ml de água destilada e esterilizada, agitada e plaqueada para placas de petri contendo meio de cultura agar-água (AA) (quantidades descritas no Anexo A). O excesso foi descartado e as placas permaneceram inclinadas por 24 h, em temperatura ambiente. Após esse período, com o auxílio de um microscópio ótico, foram observados e retirados os esporos germinados em meio AA. Apenas um esporo foi transferido para placas de petri contendo meio de cultura BDA, com o auxílio de uma alça metálica previamente flambada. As placas foram mantidas incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h até a utilização da mesma para a inoculação das sementes.

#### 3.3.3.2 Inoculação

A inoculação do fungo foi através do método de contato das sementes com as culturas fúngicas isoladas, adaptado de Sousa et al. (2008).

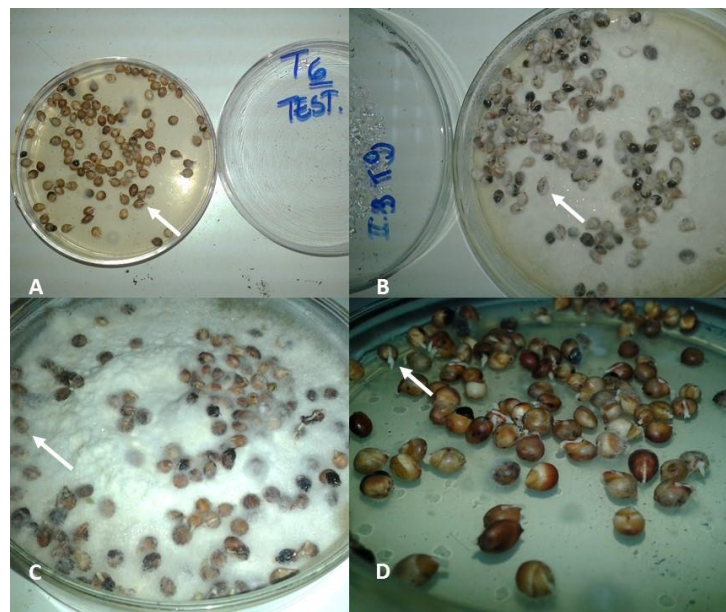
O inóculo do fungo isolado foi repicado para placas de petri através da utilização de 01 disco com 05 mm de diâmetro, disposto no centro da placa. Essa placa contendo a colônia fúngica foi mantida a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, em

incubadora tipo Biochemical oxygen demand (BOD), até a completa colonização da placa.

A assepsia das sementes foi realizada com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, após com uma solução de álcool 70% (por 30 segundos) e em seguida, lavadas em água destilada esterilizada (por 3 minutos) e deixadas secar sob papel filtro esterilizado.

Posteriormente, no interior de uma câmara de fluxo laminar, para evitar contaminação do meio externo, as sementes de cada cultivar foram colocadas em contato com as culturas fúngicas e distribuídas de maneira uniforme na placa de petri; a testemunha foi mantida apenas com contato com o meio de cultura BDA. Estas foram mantidas, por aproximadamente 24 horas, em fotoperíodo de 12 horas na BOD, até que a primeira semente iniciasse a protusão radicular (Figura 2). Após este período, as sementes inoculadas foram semeadas em bandejas, previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% e álcool 70%, contendo substrato comercial. Foram semeadas quatro repetições de 25 sementes (totalizando 100 sementes) para cada isolado testado, nas quatro cultivares pesquisadas.

Figura 2 – Sementes de sorgo sacarino em contato com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e contendo micélio de *Fusarium* sp.



Legenda: (A) testemunha (sementes apenas em contato com o meio de cultura BDA); (B) sementes em contato com o patógeno; (C) presença de micélio nas sementes; (D) protusão radicular das sementes de sorgo sacarino. Fonte: autora

### 3.3.3.3 Avaliação

Três isolados de *Fusarium* sp. foram avaliados, sendo então realizados os testes de emergência, em câmara de incubação por 30 dias com contagens diárias.

Foram realizadas avaliações de contagem de plântulas emergidas diariamente, até o 30º dia, nas quais foi determinado o número total de plântulas emergidas e número total de plântulas com sintomas (tombamento, murcha, coloração escurecida do hipocótilo, apodrecimento de sementes, plântulas mortas) devido à presença do fungo. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais e plântulas com sintomas.

### 3.3.4 Caracterização molecular

A extração do DNA genômico do patógeno ocorreu conforme método CTAB (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) descrito por Doyle e Doyle em 1991, no qual porções de micélio foram retirados de uma cultura monospórica para posterior extração do DNA genômico.

A amostra de DNA genômico foi submetida à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a amplificação do gene do Fator de Elongação 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), com os oligonucleotídeos iniciadores EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1-1567R (ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) (REHNER e BUCKLEY, 2005), e das regiões ITS do rDNA, ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990). A reação contém 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5  $\mu$ M de cada dNTPs, 20 nM de MgCl<sub>2</sub>, 25 nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, cinco unidades da enzima Taq polimerase e água MiliQ autoclavada (ultrapura) para completar o volume final da reação de 50  $\mu$ L.

As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 55 °C por 30 s, alongação a 72 °C por 35 s e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Ao final da reação, os produtos da PCR foram mantidos a frio em temperatura de 4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TAE 1X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 4 ml de EDTA a 0,5 M e 4 ml de



água destilada), contendo brometo de etídio sendo visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 a 13% para posterior sequenciamento.

O sequenciamento foi efetivado em sequenciador Mega BACE 500 (Amersham). A sequência de nucleotídeos obtida dos isolados foi comparada com as já existentes no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) através do procedimento Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências do GenBank que apresentaram maior cobertura e similaridade foram selecionadas para realizar a análise filogenética. Para isso, primeiramente as sequências de nucleotídeos foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Em seguida, a análise filogenética foi conduzida utilizando o método “Neighbour-joining” com 1000 replicatas pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007).

Após, a sequência-consenso obtida foi inserida no *GenBank*, sediado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1997), onde recebeu o código de acesso para consultas futuras.

### 3.3.5 Procedimentos estatísticos

O experimento foi desenvolvido com quatro cultivares e três épocas de semeadura, para as quais foi realizada a média dos resultados obtidos, resultando em 12 repetições. Assim sendo, utilizou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com quatro cultivares e 12 repetições.

Para o teste de patogenicidade o esquema fatorial foi de 4 x 4, sendo representado pelas quatro cultivares e os três isolados obtidos de *Fusarium* sp. e a testemunha.

A normalidade dos erros foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk, em nível de 5% de probabilidade de erro, e a variância pelo teste de Bartlett, ambos pelo software de estatística Action. Não atendendo a algum desses pressupostos, a transformação Box-Cox ou arco-seno  $\sqrt{x/100}$ , foi realizada pelo mesmo programa. Posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância e nas médias que apresentaram significância foi aplicado o teste de Tukey (P=0,05%) utilizando-se o software SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2008).

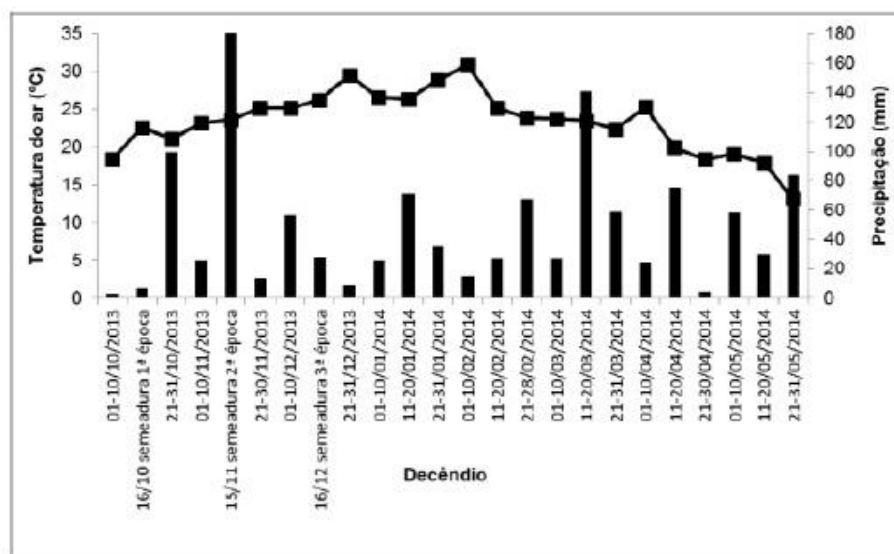
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FISIOLÓGICA DAS SEMENTES DE SORGO SACARINO

O período indicado de semeadura do sorgo sacarino é de outubro a novembro, podendo ser ampliado até fevereiro, conforme as condições ambientais e o local, contudo, este período pode ser considerado muito amplo, e dessa forma, sujeito a variações climáticas como temperaturas extremas, estiagens prolongadas e, ocasionalmente, risco de ocorrência de geadas durante o ciclo da cultura. Assim, torna-se importante estudar o comportamento das cultivares, considerando-se os riscos de ocorrência de eventos climáticos desfavoráveis e o tipo de cultivar utilizada para plantio.

A temperatura ideal de cultivo do sorgo sacarino deve estar entre 20°C e 30°C na maior parte do seu ciclo de desenvolvimento de acordo com Araujo (2012). Na Figura 3 pode-se observar que os valores de temperatura observados no decorrer do ciclo de cultivo situam-se dentro da faixa de valores indicados pela literatura, não sendo fator limitante para o seu cultivo.

Figura 3 - Valores decêndiais de temperatura média do ar e precipitação pluviométrica durante o ciclo de cultivo do sorgo sacarino safra 2013/2014, Santa Maria, RS, 2017.



Fonte: Nunes, 2015.

Araújo (2012) também cita que a precipitação deve estar entre 300 mm e 600 mm durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura. Constatou-se precipitação acumulada de aproximadamente 574,5 mm no decorrer do ciclo da cultura (Figura 3), com chuvas bem distribuídas ao longo do período, dessa forma, ressalta-se que os valores de precipitação ocorridos no decorrer do presente trabalho, foram suficientes para atender as exigências hídricas da cultura.

Já na caracterização física das sementes de *Sorghum bicolor*, o teor de água manteve-se em 12% de umidade. De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), o teor de água adequado para a colheita do sorgo está entre 16% a 18%. Contudo, para armazenamento, o ideal é que a umidade permaneça entre 11 e 13% (MARCOS FILHO, 1999). Para estes autores, a uniformização do teor de água é imprescindível para a padronização das avaliações e contribui na obtenção de resultados consistentes. Os dados do teor de água não foram analisados estatisticamente, servindo desta forma apenas para a caracterização física inicial dos lotes de sementes avaliados.

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes pode ser observada na tabela 1. Na determinação da primeira contagem de germinação observa-se que não houve diferenças estatísticas entre as diferentes cultivares. Já avaliando a porcentagem de germinação tem-se que não foram constatadas diferenças estatísticas entre as cultivares BRS 506, Fepagro 19 e BRS 511, sendo os percentuais de germinação de 78%, 86% e 76%, respectivamente, contudo, diferem estatisticamente da cultivar BRS 509, a qual apresentou 66% de plântulas normais.

Tabela 1 – Primeira contagem da germinação (PCG), germinação de plântulas normais (GER), plântulas anormais (PAN), sementes mortas (SM), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento radicular (CPR), comprimento total (CTO), massa seca de plântula (MSP), envelhecimento acelerado (EA), emergência (E), comprimento de parte aérea da emergência (CPAE), massa seca de plântula da emergência (MSPE) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de sorgo sacarino.

Parâmetros	Cultivares de sorgo				
	BRS 506	Fepagro 19	BRS 511	BRS 509	CV (%)
PCG (%)*	37 a**	27 a	38 a	46 a	42,71
GER (%)*	78 a	86 a	76 a	66 b	11,52
PAN (%)*	8 a	6 a	9 a	8 a	62,80
SM (%)*	14 b	8 b	15 b	26 a	42,82
CPA (cm)	3,5 ab	4,1 a	3,4 b	3,8 ab	16,69
CPR (cm)	6,1 ab	6,6 a	5,7 b	6,2 ab	12,60
CTO (cm)	9,6 ab	10,7 a	9,1 b	10,0 ab	12,07
MSP (mg pl <sup>-1</sup> )	3,050 ab	2,342 b	3,542 ab	4,025 a	42,10
EA (%)*	85 ab	85 ab	91 a	80 b	21,67
E (%)*	88 ab	91 a	89 a	80 b	9,60
CPAE (cm)	9,7 c	12,7 b	11,8 b	16,2 a	13,00
MSPE (mg pl <sup>-1</sup> )	1,125 b	1,442 aab	1,292b	1,825 a	28,32
IVE	4,503 a	4,562 a	4,270 ab	3,936 b	10,10

\*Dados transformados por Box-cox. \*\*Médias não seguidas pela mesma letra diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

A instalação de uma cultura geralmente é efetuada com base nos resultados do teste de germinação, e para a comercialização de sementes, o percentual de germinação exigido para o sorgo é de 80% (INSTRUÇÃO NORMATIVA, 2013). Neste sentido, apenas a cultivar Fepagro 19 apresentou porcentagem de germinação que permitisse sua comercialização (86%).

Lopes et al. (2016), verificou que a germinação da cultivar BRS 506 foi superior àquela da cultivar SF-15, 91% e 80%, respectivamente. Ullmann et al. (2015), trabalhando na região do cerrado com a cultivar BRS 506 também observaram elevadas porcentagens de germinação chegando a obter porcentagens médias de 94%. Nunes (2015), avaliando as mesmas cultivares deste trabalho, épocas de semeadura e espaçamentos, constatou que a semeadura realizada em

novembro, para todas as cultivares, houve percentuais acima de 80% de germinação. Resultado não semelhante neste trabalho, pois apenas a cultivar Fepagro 19 atingiu o percentual de no mínimo 80% de plântulas normais.

O baixo percentual de germinação pode estar associado à dormência pós-colheita presente nas sementes desta cultivar. A inibição da germinação pode ser ativada pela presença de certas substâncias na cobertura ou na parte interna das sementes. De acordo com Marcos Filho (2005), estas substâncias bloqueiam o metabolismo preparatório para a geminação ou impedem o acesso do oxigênio ao embrião ou a liberação de gás carbônico. São conhecidos vários tipos de inibidores da germinação, entre eles, os taninos, frequentemente encontrados em sementes de sorgo. Hartmann et al. (1997), também constataram que a presença de substâncias fenólicas no tegumento inibiu a germinação das sementes de sorgo. Queiroz (1979) observou alta correlação entre a presença de tanino com a germinação das sementes de sorgo, mas que, de modo geral, a dormência não perdura por mais de três meses. Segundo o autor, as sementes de sorgo tendem a superar a dormência com o armazenamento, contudo, não se sabe se é devido a conservação em baixas temperaturas ou à redução de compostos fenólicos no tegumento. Apesar das sementes de sorgo serem mantidas em câmara fria (processo indicado para superar a dormência), e serem utilizadas após três meses de armazenamento, o teor de tanino presente nestas sementes pode ter influenciado no processo germinativo.

Na tabela 1, observa-se que não houve diferenças estatísticas para a variável plântulas anormais nas diferentes cultivares. Contudo, avaliando-se a porcentagem de sementes mortas, nota-se que a cultivar BRS 509 apresentou porcentagem superior (26% de sementes mortas) quando comparada as demais cultivares. A porcentagem inferior de germinação desta cultivar pode estar relacionada a elevada porcentagem de sementes mortas encontradas no teste. Já o número de sementes mortas pode estar associado a presença de fungos causadores de apodrecimento nas sementes, como os fungos da espécie *Fusarium*, com alta incidência nestas cultivares (será discutido no decorrer do trabalho).

A presença de fungos, tanto de campo, quanto de armazenamento nas sementes pode ser um fator a interferir no aumento do processo deteriorativo da semente, pois os mesmos podem interagir nos processos metabólicos acelerando a deterioração das sementes. Alguns fungos podem produzir enzimas e toxinas que

podem danificar membranas, inibir a clorofila, aumentar a lixiviação de solutos e inibir a germinação das sementes (PESKE, 2003). Para Freitas (2009), durante o armazenamento, regiões das sementes que sofreram algum tipo de injúria mecânica podem servir como entrada para infecções, e dessa forma, acelerar a deterioração das sementes. De acordo com Dhingra (1985), os fungos que atacam as sementes durante o armazenamento são os grandes responsáveis pela perda de qualidade destas, sendo os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* os principais.

Avaliando-se o comprimento da parte aérea e radicular, comprimento total e massa seca (Tabela 1) de plântulas normais obtidas do teste de germinação, observa-se que a cultivar Fepagro 19 obteve desenvolvimento superior quando comparada as demais cultivares (10,7 cm de comprimento total), mas que não diferiu estatisticamente das cultivares BRS 506 (com 9,6 cm) e BRS 509 (com 10 cm). Menor comprimento foi identificado para a cultivar BRS 511, sendo registrada a média de 9,1 cm de comprimento total.

Para Guedes et al. (2009), o comprimento de plântulas, ou de parte delas, é um teste sensível que permite classificar, ou confirmar, lotes com pequenas diferenças de qualidade fisiológica. Lopes et al. (2016) afirmam também que em locais com distribuição irregular de chuvas, o comprimento da raiz é uma característica que ajuda a planta a se manter no ambiente, pois com raízes mais desenvolvidas a planta tem um maior suprimento de água. Além disso, essa maior capacidade de aprofundamento das raízes no solo favorece a sobrevivência da planta em condições de déficit hídrico.

Os resultados do teste de envelhecimento acelerado também são encontrados na tabela 1. De acordo com a tabela, as cultivares apresentaram porcentagem de plântulas normais superiores às obtidas no teste de germinação, variando, conforme a cultivar, de 80% a 91% de plântulas normais (BRS 509 e BRS 511, respectivamente).

O teste de envelhecimento acelerado é um dos mais utilizados para avaliação do vigor de sementes, tendo em vista que as mesmas são submetidas ao estresse de temperatura e umidade. Nestas condições ocorre a aceleração da taxa de deterioração das sementes, assim, nas condições de ambiente, sementes mais vigorosas deterioram mais lentamente do que as sementes menos vigorosas (MARCOS FILHO, 1999). Além disso, pode estimar a longevidade e a viabilidade

das sementes no armazenamento, dependendo das espécies e das condições em que os lotes foram armazenados (MILOSEVIC et al., 2010; MARCOS FILHO, 2015). Contudo, para este trabalho, a combinação de temperatura e período de exposição pode não ter sido suficiente para causar estresse nas sementes, não permitindo assim, a diferenciação das cultivares.

De acordo com as pesquisas, Ibrahim et al. (1993) estudaram três temperaturas (41, 43 e 45°C) e três períodos de exposição (24,48 e 72 horas), para sementes de sorgo tratadas ou não; os lotes foram efetivamente separados em níveis de vigor nas condições de 43°C/72 horas e 45°C/48 horas, mostrando também alta correlação com a emergência das plântulas em campo. Maeda e Sawazaki (1982), estudaram diferentes cultivares de sorgo granífero em diferentes locais utilizando a temperatura de 42 °C por 48 horas de exposição. Nunes (2015), também não observou diferenças significativas avaliando diferentes cultivares de sorgo sacarino. Outros estudos demonstram que espécies de sementes pequenas pode ocorrer variação acentuada do teor de água nas amostras, após o envelhecimento acelerado, interferindo nos resultados do teste.

Na tabela 1 também estão expressas as porcentagens de plântulas normais obtidos no teste de emergência (E) realizado nas bandejas, bem como o índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de parte aérea (CPAE) e massa seca (MSPE) destas plântulas. É possível observar que não houve diferenças significativas no percentual de plântulas normais da emergência entre as cultivares Fepagro 19 e BRS 511, 91% e 89%, respectivamente, contudo, houve diferenças entre estas e a cultivar BRS 509, que apresentou 80% de plântulas normais na avaliação. O IVE observado também informa que não há diferenças entre as cultivares BRS 506, Fepagro 19 e BRS 511, contudo, há diferenças destas com a cultivar BRS 509. Gustafson et al. (2004) afirmam que plantas com elevada velocidade de emergência e de crescimento inicial se sobressaem em relação a plantas com menor desenvolvimento pois há maior utilização dos recursos do meio.

O Índice de velocidade de emergência é importante na avaliação da qualidade das sementes, pois de acordo com Marcos Filho (2005) este teste mede a velocidade com que as plântulas emergem do solo, portanto quanto maior for o índice, maior será o vigor das sementes. A uniformidade e velocidade de emergência das plântulas são componentes importantes do desempenho das

sementes e afetam diretamente o estabelecimento do estande. Sementes vigorosas mobilizam reservas de tecidos de armazenamento para o eixo do embrião de forma mais eficiente e essa capacidade é refletida em crescimento das mudas (MARCOS FILHO, 2015); além disso, a germinação rápida geralmente corresponde a mais rápida emergência das plântulas em campo.

Os testes de massa seca e comprimento de plântulas são considerados, assim como o de velocidade de germinação, como testes que consideram que lotes que apresentam sementes mais vigorosas, originarão plântulas com maiores taxas de desenvolvimento e ganho de massa, pois apresentam maior capacidade de transformação dos tecidos e suprimento das reservas dos tecidos de armazenamento na composição e formação do eixo embrionário (AMARO, 2010; DAN et al., 1987; FRIGERI, 2007; PERES, 2010). Neste trabalho, a cultivar BRS 509 apresentou o maior comprimento de parte aérea da plântula, apresentando resultado significativamente superior (16,2 cm) à cultivar BRS 506 (9,7 cm). Dentre os fatores que podem ter contribuído para o maior crescimento da parte aéreas destas plântulas pode ser a maior eficiência na competição por luz e rapidez na expansão foliar. Para May et al. (2012), a competição por luz interfere no crescimento das plantas, pois a mesma é fonte de energia e é fundamental nos processos metabólicos essenciais ao crescimento vegetal.

Em trabalho realizado por Lopes et al. (2016), os mesmos constataram que a cultivar BRS 506 apresentou maior comprimento de parte aérea, com 12,09 cm; já para a massa seca, os valores foram de 0,0038 g e 0,0071 g para massa seca de raiz e parte aérea, respectivamente. Contudo, neste trabalho, a cultivar BRS 506 apresentou resultados significativamente inferiores as demais cultivares.

Na caracterização fisiológica das sementes de sorgo sacarino utilizadas neste trabalho observou-se que a cultivar BRS 506 não diferiu estatisticamente da cultivares Fepagro 19 e BRS 511 no teste de germinação, na porcentagem de plântulas anormais e de sementes mortas, bem como nos comprimentos totais de plântulas, massa seca, envelhecimento acelerado, emergência e IVE. Contudo, a cultivar BRS 509 apresentou menor porcentagem de germinação sendo significativamente inferior as demais cultivares, bem como maior porcentagem de sementes mortas. Além disso, nos testes de vigor, foi verificada menor porcentagem



de plântulas normais no envelhecimento acelerado e no teste de emergência, bem como menor IVE.

Para Munizzi et al. (2010), é importante determinar a qualidade fisiológica das sementes, pois estas avaliações influenciam no desempenho, na emergência, no índice de velocidade de emergência, na viabilidade e na manutenção do vigor, propiciando uma aceleração no processo de germinação das sementes, e assim, produzindo plântulas com maior tamanho inicial e com possibilidade de maior produtividade.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO SANITÁRIA DAS SEMENTES DE SORGO SACARINO

### 4.2.1 Teste de sanidade

Como pode ser observado, há uma elevada incidência de espécies fúngicas associadas às sementes de sorgo sacarino (Tabela 2), não havendo diferenças significativas entre as cultivares observadas. Ou seja, não são observadas predisposição de alguma cultivar ou não a presença de patógenos. Foram observados, com maior incidência os seguintes gêneros: *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Dreschelera* spp., *Penicillium* spp. e *Epicoccum* spp.

Tabela 2 – Sementes totais infestadas por microrganismos fúngicos e os principais gêneros associados às sementes de sorgo sacarino na avaliação da qualidade sanitária.

Parâmetros	Cultivares de sorgo				
	BRS 506	Fepagro 19	BRS 511	BRS 509	CV (%)
Sementes totais infestadas (%)*	69,3 a**	86,0 a	79,5 ab	83,5 ab	21,66
<i>Fusarium</i> spp. (%)*	65,5 a	57,7 a	63,5 a	62,5 a	16,71
<i>Alternaria</i> spp. (%)*	10,4 b	37,1 a	24,0 ab	15,6 b	38,42
<i>Aspergillus</i> spp. (%)*	0,6 b	0,3 b	4,0 a	4,9 a	85,39
<i>Dreschelera</i> spp. (%)*	11,1 a	2,3 b	3,3 b	7,2 ab	52,85
<i>Penicillium</i> spp. (%)*	1,3 a	0,3 a	1,8 a	2,6 a	81,69
<i>Epicocum</i> spp. (%)*	11,1 a	2,3 b	3,3 b	7,2 a	52,85

\* Os dados expressos em percentagem foram transformados em arco-seno  $\sqrt{x/100}$ . \*\*Médias não seguidas pela mesma letra diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

As cultivares BRS 506 e BRS 509 não apresentaram diferenças estatísticas para a presença de *Alternaria* spp. nas sementes (Tabela 2), 10,4% e 15,6%, respectivamente, contudo, ambas apresentaram menor incidência quando comparada à cultivar Fepagro 19, com 37,1% de presença em suas sementes. *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (Tabela 2) são considerados fungos de armazenamento e podem estar associados as sementes causando apodrecimentos das mesmas, assim como originar plântulas anormais e inviáveis (DHINGRA, 1985). Não houve diferenças estatísticas entre as cultivares para a presença de *Penicillium* spp., já para *Aspergillus* spp., maior incidência foi observada nas cultivares BRS 511 e BRS 509.

Flavio et al. (2014), avaliando a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo, cultivar BR 310, identificaram no teste de sanidade os gêneros *Penicillium* (12,8%), *Curvularia* (43%), *Fusarium* (29,2%) e *Aspergillus* (14,3%) como os mais frequentes, além de *Drecheslera*, *Alternaria* e *Chaetomium*. Martins Netto et al. (1998) também relataram que os principais fungos ocorrentes em sementes de sorgo são *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium*. Pinto (2004), avaliando a qualidade sanitária de sementes de sorgo, cultivar BR 506, identificou as espécies *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Phoma* spp., *Curvularia* spp., e *Drechslera*. Reverberti et al. (2010), alertam que além de deteriorarem grãos e sementes, espécies do gênero *Aspergillus* são produtoras de micotoxinas, tóxicas para os seres humanos, animais e plantas.

Funnell-Harris et al. (2014), relatam que os patógenos presentes nas panículas de sorgo podem afetar negativamente o rendimento de grãos, a qualidade e viabilidade dos mesmos; já agentes patogênicos radiculares, de colmo e folhas podem reduzir o rendimento da biomassa, prejudicando a colheita. O mesmo autor relata que os componentes primários das paredes celulares são polissacarídeos, celulose e hemicelulose, que podem ser divididos em açúcares e convertidos em etanol, assim, a presença destes patógenos pode interferir na produção de etanol.

Contudo, dentre estes gêneros identificados no trabalho, a incidência maior observada foi de *Fusarium* spp., variando de 57,7% (cultivar Fepagro 19) a 65,5% (cultivar BRS 506), mesmo sem diferenças estatísticas com as demais cultivares. Brancão et al. (2002), avaliando a incidência de fungos em sementes de sorgo também encontraram *Fusarium* spp. associado às mesmas. Dentre os genótipos de

sorgo biomassa avaliados em Cáceres, foram observados sete gêneros de fungos, sendo *Colletotrichum graminicola* e *Fusarium* sp. os de maior importância para a cultura (VENDRUSCOLO et al., 2016). Os fungos que causam a podridão de sementes e “damping-off”, incluindo *Fusarium*, são patógenos parasitas que estabelecem relações nas fases iniciais do desenvolvimento da planta, deste modo podem interferir negativamente na densidade de plantio no campo de produção (MACIEL, 2016).

Chehri et al. (2011), identificaram 19 espécies de *Fusarium* associados à doença de gibberella em trigo, com maior porcentagem de espigas infectadas por *Fusarium graminearum* (75%), seguido por *F. culmorum* (65%), *F. crookwellense* (50%), *F. trichothecioides* (50%), *F. chlamydosporum* (50%), *F. avenaceum* (45%), *F. verticillioides* (45%) e *F. sporotrichioides* (45%). Sementes de 13 genótipos de *Sorghum bicolor* foram inoculadas com *Fusarium* spp. e *Curvularia lunata*, identificando correlação positiva entre a infecção com espécies de *Fusarium* spp. e a germinação das sementes (GARUD; ISMAIL; SHINDE, 2000).

Segundo Flavio et al. (2014), inóculos presente nas sementes podem resultar em aumento progressivo da doença, reduzindo assim o valor comercial da cultura. Para Souza, Araujo e Nascimento (2007), espécies do gênero *Fusarium* podem produzir micotoxinas, além disso pode causar redução da capacidade germinativa, descoloração ou formação de manchas, apodrecimentos, mofos e transformações bioquímicas nas sementes.

#### **4.2.2 Transmissão e patogenicidade de *Fusarium* spp.**

Os resultados do teste de transmissão, apresentados a seguir (Tabela 3), complementam o teste de sanidade, pois irão comprovar se os fungos presentes nas sementes serão transmitidos para as plântulas.

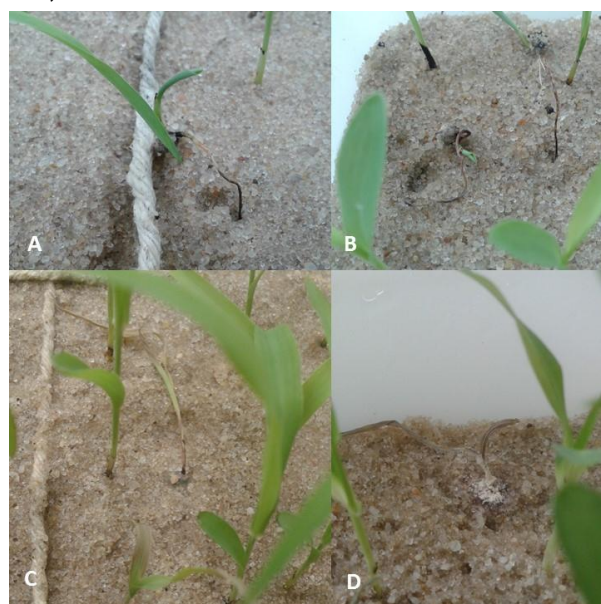
Tabela 3 – Média de plântulas normais (%) e plântulas com sintomas de *Fusarium* spp. (%) observadas no teste de transmissão de quatro cultivares de sorgo sacarino, safra 2013/2014, Santa Maria, RS.

Parâmetros	Cultivares de sorgo				CV (%)
	BRS 506	Fepagro 19	BRS 511	BRS 509	
Plântulas normais	83 b**	90 a	81 b	69 c	5,51
Plântulas com sintomas	17 b	10 c	19 b	32 a	13,82

\*Os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco-seno  $\sqrt{x/100}$ . \*\*Médias não seguidas pela mesma letra diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

Na tabela 3 é possível observar que a cultivar BRS 509 apresentou a menor porcentagem de plântulas normais (69%) e a maior porcentagem de plântulas com sintomas (32%), seguida das cultivares BRS 511 (19%) e BRS 506 (17%). A cultivar Fepagro 19 apresentou a menor porcentagem de plântulas com sintomas (8%), bem como o maior índice de plântulas normais (90%). Os principais sintomas causados por *Fusarium* spp. e observados foram tombamento, murcha, coloração escurecida do hipocótilo e plântulas mortas, podendo ser visualizados na figura 4.

Figura 4 – Sintomas causados por *Fusarium* sp. em plântulas de sorgo sacarino, Santa Maria, RS.



Legenda: (A) plântula com coloração escurecida no hipocótilo causado por *Fusarium* spp.; (B) plântula com sintoma de tombamento; (C) sintoma de murcha ocasionada pela presença de *Fusarium* spp., e (D) morte de plântula e presença de micélio de *Fusarium* spp. Fonte: autora

A transmissão dos patógenos da semente para planta depende de fatores como: severidade de infecção da semente, localização do inóculo na semente, umidade e temperatura do solo, vigor e genética de resistência da cultivar. A presença de alguns fungos na semente pode não acarretar problemas na fase de estabelecimento de plântulas. Porém, estes podem ser transmitidos e ao final do ciclo da cultura, provocar podridão da base do colmo.

A podridão vermelha do colmo (*Fusarium verticillioides*) é comum em todas as regiões onde se cultiva o sorgo. O fungo pode causar podridão de sementes e morte das plântulas (COTA et al., 2010; PANIZZI; FERNANDES, 1997), reduzindo o “stand” de plantas na lavoura. A redução na produção e na qualidade de grãos e de forragem é atribuída a ela por afetar também o enchimento dos grãos e provocar o enfraquecimento do colmo, causando, geralmente, tombamento e/ou podridão do mesmo. Este patógeno pode infectar as sementes, as raízes, o colmo e o pedúnculo da planta, comprometendo a firmeza do tecido interno.

Segundo May (2013), quando há transporte de sementes infectadas para novas áreas, principalmente com alta quantidade de inóculo e plantios contínuos com a mesma cultivar, a durabilidade da resistência das cultivares é afetada, por causa da possibilidade de superação da resistência, devido a variabilidade dos patógenos.

A realização do teste de patogenicidade pode confirmar ou excluir a hipótese de que os fungos encontrados associados às sementes e transmitidos por elas, são mesmos patogênicos à espécie em estudo. Na tabela 4, encontram-se os resultados do teste de patogenicidade de três isolados de *Fusarium* sp. em plântulas de sorgo sacarino, inoculados via semente.

Tabela 4 – Emergência e plântulas sintomáticas do teste de patogenicidade com inoculação de *Fusarium* sp. em sementes de quatro cultivares de sorgo sacarino, safra 2013/2014, Santa Maria, RS.

Parâmetros	Testemunha + isolados	Cultivares de sorgo				CV (%)
		BRS 506	Fepagro 19	BRS 511	BRS 509	
Plântulas normais	Testemunha	83 Ab	74 Bbc	80 Aa	80 Aa	6,33
	Isolado 01	90 Aa	80 Abc	78 Ba	79 Ba	
	Isolado 02	81 Ab	83 Aa	81 Aa	65 Bb	
	Isolado 03	74 ABc	73 ABc	78 Aa	69 Bb	
Plântulas com sintomas	Testemunha	1 Bab	7 Aa	4 Aba	2 Ba	96,72
	Isolado 01	0 Bb	5 Aa	4Aa	4 Aa	
	Isolado 02	0 Bb	0 Bb	2 ABab	4 Aa	
	Isolado 03	3 Aa	2 ABa	0 Bb	4 Aa	
Plântulas mortas	Testemunha	0 Bb	3 Aa	2 Aa	3 Aab	86,0
	Isolado 01	0 Bb	3 Aa	3 Aa	3 Aab	
	Isolado 02	0 Bb	1 Bb	3 Aa	6 Aa	
	Isolado 03	5 Aa	3 ABa	3 ABa	4 Aa	
Sementes mortas	Testemunha	16 Aa	16 Aab	15 Aa	15 Ab	15,0
	Isolado 01	10 Ab	12 Ab	15 Aa	15 Ab	
	Isolado 02	19 Aa	16 Bab	15 Ba	25 Aa	
	Isolado 03	17 ABa	22 Aa	19 ABa	23 Aa	

\* Os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco-seno  $\sqrt{x/100}$ . \*\*Médias não seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

Para a cultivar BRS 511 não houve diferenças significativas entre os isolados, já nas demais cultivares o isolado 3 apresentou porcentagens inferiores de plântulas normais. Com relação a plântulas sintomáticas, na cultivar BRS 506, o isolado 3 novamente apresentou as maiores porcentagens. Já na cultivar BRS 509 não houve diferenças entre a testemunha e os isolados testados no trabalho. O percentual de plântulas mortas também foi significativamente superior no isolado 3 quando avaliada a cultivar BRS 506, não ocorrendo diferenças significativas entre os demais. Já a cultivar Fepagro 19 apresentou menor porcentagem na presença do isolado 2, quando comparada as demais. Para as demais cultivares não foram observadas diferenças significativas entre os isolados e a testemunha.

O percentual de sementes mortas não diferiu estatisticamente dentro da cultivar BRS 511. Contudo, na cultivar BRS 506, na Fepagro 19 e na BRS 509 não houveram diferenças estatísticas entre os isolados 2 e 3. Dessa forma, de forma

geral, tem-se que o isolado 3 pode ser considerado o mais agressivo, tanto pela redução significativa de plântulas normais e pela maior porcentagem de plântulas com sintomas ou que chegaram a morrer após alguns dias de realização do teste.

Visualmente as principais diferenças entre os isolados e a testemunha podem ser observados na Figura 5.

Figura 5 – Plântulas ao final do teste de patogenicidade com três isolados de *Fusarium* sp. e a testemunha, realizadas com sementes de sorgo sacarino, safra 2013/2014, Santa Maria, RS.



Legenda: (A) plântulas após inoculação de *Fusarium* sp., isolado 9; (B) plântulas após inoculação de *Fusarium* sp., isolado 3; (C) plântulas após inoculação de *Fusarium* sp., isolado 5; (D) testemunha (sem inoculação de *Fusarium* sp.). Fonte: autora.

Dessa forma, é possível constatar que os três isolados de *Fusarium* sp. foram considerados patogênicos a cultura do sorgo sacarino, sendo transmitidos via semente e ocasionando sintomas característicos da patógeno, tais como tombamento, morte de plântulas e podridão de sementes. A infecção também foi comprovada pela presença de sementes totalmente colonizadas pelo patógeno e plântulas com presença de micélio, como pode ser observado na figura 6. Sintomas como estrangulamento da região do colo, evoluindo para a morte da plântula também foram observados.

Figura 6 – Sintomas causados pela associação com *Fusarium* sp. em sementes e plântulas de sorgo sacarino.



Legenda: (A) presença de micélio de *Fusarium* sp nas plântulas de sorgo sacarino; (B) morte de plântulas; (C) sintoma de tombamento de plântula causado pela inoculação de *Fusarium* sp. nas sementes; (D) Fonte: autora

Avaliando diferentes métodos de inoculação, Sousa et al. (2008) verificaram que o método de contato direto com o micélio fúngico de *Fusarium* sp., destacou-se como um dos mais eficazes para causar infecção de sementes de algodoeiro. Além do tempo de contato entre patógeno e hospedeiro, para que uma doença possa se desenvolver, é importante que ocorra a interferência do ambiente. Caso haja alteração em algum desses fatores (patógeno, hospedeiro e ambiente), podem ocorrer variações na incidência e na severidade da doença (SOUSA et al., 2008). Outros fatores também podem estar envolvidos nessas relações, como a produção de micotoxinas por alguns patógenos, as quais podem interferir na patogenicidade e também nas interações entre hospedeiro e patógeno.

Castrillon et al. (2016), avaliou a patogenicidade de *Ramulispora sorghi* em nove genótipos de sorgo sacarino, entre estes, cinco foram considerados suscetíveis ao patógeno. Neste trabalho, o genótipo BRS 506 foi considerado moderadamente



resistente. Sharfun-Nahar e Mushtaq (2006) relataram transmissão de *F. moniliformis* em sementes de girassol para as plântulas, apresentando sintomas no teste de patogenicidade como podridão, murchamento e redução do crescimento. Para Walker et al. (2016), os resultados da avaliação da emergência de plântulas, após a inoculação de isolados de *Fusarium* spp. também demonstraram que o fungo foi patogênico causando tombamento de pré e pós-emergência em plântulas de *Cordia americana*, sendo observado apodrecimento das raízes, necrose do hipocótilo seguida de ruptura.

Yago et al. (2011), identificaram 18 gêneros fúngicos com 34 espécies em sementes de sorgo, sendo as principais a *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme* e *Phoma* sp., além disso, observaram que as taxas de germinação *in vitro* e *in vivo* foram maiores com sementes desinfectadas e solos esterilizados, indicando que havia uma fonte de inóculo nas sementes e que inibiu a germinação das mesmas. Os autores também isolaram os patógenos do endosperma e do embrião das sementes, identificando uma mortalidade considerável de mudas (pois estes patógenos geralmente atacam na fase de plântula), sendo que as espécies de *Alternaria* e *Fusarium* apresentaram maior colonização no embrião. Os autores concluíram que todos os fungos transmitidos por sementes podem ser fonte primária de infecção de culturas de sorgo.

Yago et al. (2011), sugerem que a transmissão de fungos através de sementes de sorgo, pode estar relacionada ao amido presente nestas sementes, sendo que o teor médio do sorgo é de 69,5%, maior por exemplo, que do milho (56,3%). Outro fator segundo os autores, é a dureza do grão, grãos mais duros tem menor infecção em comparação a grãos mais tenros. Muitos destes fatores contribuem também para as diferenças de resistência à infecção pelos patógenos.

Prom et al. (2003), inoculando espécies de *Fusarium thapsinum* e *Curvularia lunata* em cultivares de sorgo, verificaram que houve redução na germinação em todas as cultivares.

#### **4.2.3 Identificação molecular de *Fusarium* sp.**

A partir dos resultados anteriormente obtidos, os três isolados foram encaminhados para a caracterização molecular, a fim de classifica-los em nível de

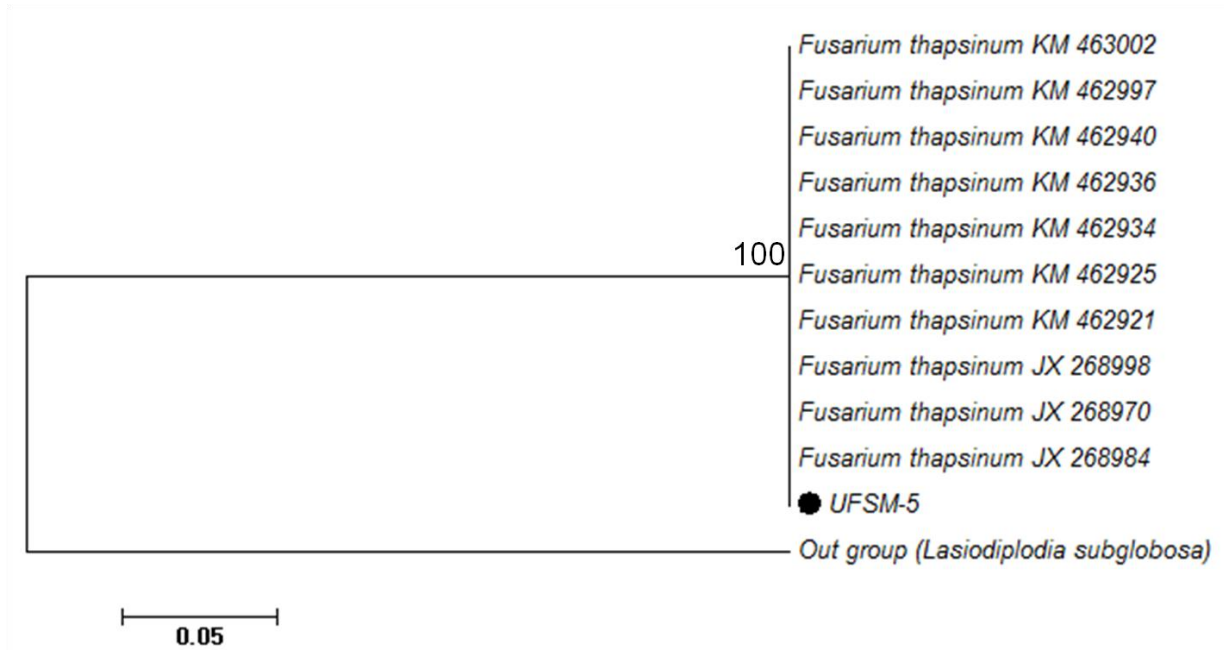
espécie. Foram caracterizadas as regiões ITS e do gene do fator de alongação 1- $\alpha$ , contudo, as duas análises e os três isolados apresentaram resultados semelhantes, sendo assim, a construção da árvore filogenética foi baseada no fator de alongação 1- $\alpha$ , na qual dez acessos do GenBank que apresentaram maior cobertura ( $\geq 95\%$ ) e similaridade foram escolhidos ( $\geq 98\%$ ) (Tabela 5) e na região ITS (Tabela 6).

Tabela 5 - Acesso no GenBank, cobertura (%), similaridade (%), e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica do gene fator de alongação 1- $\alpha$ .

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>F. thapsinum</i>	KM 463002	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	KM 462997	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	KM 462940	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	KM 462936	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	KM 462934	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	KM 462925	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	KM 462921	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	JX 268998	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	JX 268970	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2013
<i>F. thapsinum</i>	JX 268984	100%	100%	Funnell-Harris et al., 2013

O dendrograma filogenético (Figura 7), produzido após alinhamento da sequência dos isolados de *Fusarium* sp. (UFSM 5) do presente estudo com sequências de *F. thapsinum* já depositas no “GenBank”, alocou o isolado UFSM 5 (representando também os demais isolados) em um único clado. O valor do “bootstrap” foi de 100 para o mesmo clado. Com isso, foi possível identificar o isolado (UFSM 5) como sendo *F. thapsinum*. De acordo com Schroers et al., (2009), somente valores de bootstrap superiores a 90% são considerados altos e relevantes para determinação da espécie. Sendo assim, o sequenciamento do gene fator de alongação 1-  $\alpha$  foi eficiente para a identificação dessa espécie de fungo.

Figura 7 - Dendrograma filogenético baseado no método Neighbor-joining a partir de sequências de DNA do fator de alongação 1- $\alpha$ . O número sobre os ramos indica a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).



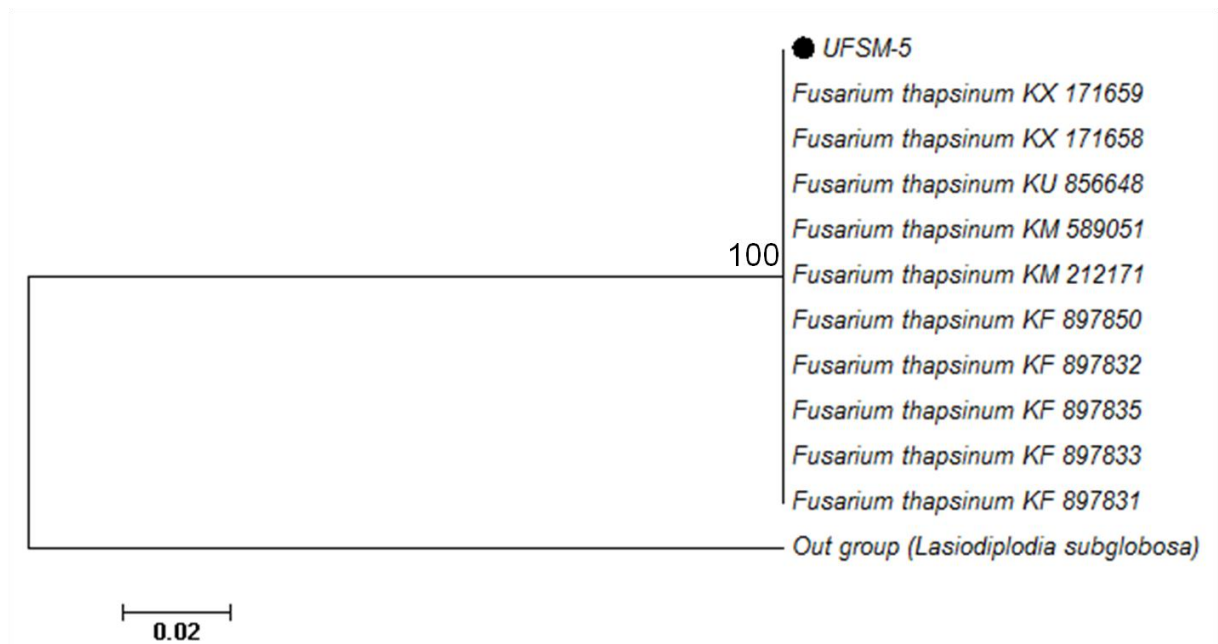
De acordo com os dados moleculares, observa-se que não houve variações de espécies entre os isolados patogênicos de *Fusarium*. Os isolados são considerados semelhantes entre si, apresentando alta porcentagem de cobertura e similaridade com a mesma espécie. Concluiu-se que os três isolados pertencem a mesma espécie, *Fusarium thapsinum*, com um “bootstrap” de 100.

Confirmando os dados obtidos com o sequenciamento do gene de fator de alongação 1- $\alpha$ , na tabela 6 são apresentados a construção da árvore filogenética baseada na região ITS, na qual dez acessos do GenBank que apresentaram maior cobertura ( $\geq 95\%$ ) e similaridade foram escolhidos ( $\geq 98\%$ ), bem como o dendograma filogenético construído (Figura 8).

Tabela 6 - Acesso no GenBank, cobertura (%), similaridade (%), e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>F. thapsinum</i>	KX 171659	100%	100%	Stokholm et al., 2016
<i>F. thapsinum</i>	KX 171658	100%	100%	Stokholm et al., 2016
<i>F. thapsinum</i>	KU 856648	100%	100%	-
<i>F. thapsinum</i>	KM 589051	100%	100%	-
<i>F. thapsinum</i>	KM 212171	100%	100%	Andresen et al., 2015
<i>F. thapsinum</i>	KF 897850	100%	100%	-
<i>F. thapsinum</i>	KF897832	100%	100%	-
<i>F. thapsinum</i>	KF897835	100%	100%	-
<i>F. thapsinum</i>	KF897833	100%	100%	-
<i>F. thapsinum</i>	KF897831	100%	100%	-

Figura 8 - Dendrograma filogenético baseado no método Neighbor-joining a partir de sequências de DNA da região ITS. O número sobre os ramos indica a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).



Para construir a árvore filogenética, com base tanto na região ITS e fator de alongação 1- $\alpha$ , adesões no GenBank que apresentaram maior cobertura ( $\geq 95\%$ ) e similaridade foram escolhidos ( $\geq 98\%$ ). O isolado foi alocado em uma única clade, *F. thapsinum*, com uma inicialização de 100 para fator de alongação 1- $\alpha$  e na região ITS.

De acordo Geiser et al. (2004), o gene que codifica o fator de alongação 1- $\alpha$  (*TEF1*) tornou-se o marcador mais comum, já que é um altamente informativo para *Fusarium*. Schoch et al. (2012) enfatizam a importância de marcadores específicos de *Fusarium*, tais como o fator de alongação 1- $\alpha$ , e, indicam também a região ITS como um código universal para a identificação de fungos. A região ITS foi considerado eficiente para a identificação e separação de *Fusarium* (Menezes et al., 2010). Marcadores moleculares, ITS e *TEF1*, são consideradas ferramentas práticas, rápidas e com baixo custo, eficiente para a discriminação e identificação de espécies de *Fusarium* (ARIF et al., 2012). Funnell-Harris et al. (2010), também identificaram as espécies *Fusarium thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* em sementes de sorgo, utilizando para as sequências os genes do fator de alongação 1- $\alpha$ .

O elevado suporte de “bootstrap”, igual a 100, indicou que não houve desvio entre os dados originais da matriz de similaridade e os dados utilizados para a construção do dendrograma, o que explica adequadamente os dados. Portanto, de acordo com o sequenciamento da região ITS e fator de alongação 1- $\alpha$ , pode-se concluir a caracterização molecular deste isolado, pois os mesmos fornecem subsídios suficientes para enquadrá-lo como *Fusarium thapsinum*.

Klittich et al. (1997), identificaram um grupo de estirpes distintas de *Fusarium* que produziam um pigmento amarelo bem característico, sendo denominado de *F. thapsinum*, e tem como seu teleomorfo, *Gibberella thapsina*. De acordo com os autores, esta espécie é morfologicamente semelhante a *Fusarium moniliforme* mas os dois grupos são isolados reprodutivamente e podem ser distinguidos por outros caracteres como micotoxinas, polimorfismo de isoenzimas, cariótipo eletroforético, sensibilidade ao benomil e diferenças nas regiões ITS do DNA.

De acordo com Leslie et al. (2004), o complexo *Gibberella fujikuroi* contém espécies de *Fusarium* das seções Liseola e Elegans, e é composta de nove espécies biológicas reprodutivamente isoladas (populações de acasalamento). Foram atribuídos nomes separados de espécies de *Gibberella* e numerosos anamorfos de *Fusarium* foram adicionados às seções de Liseola e Elegans, com base nas diferenças de morfologia e/ou de sequência de DNA. Segundo os autores, estas espécies de *Fusarium* têm uma distribuição mundial e causam doenças em uma grande variedade de plantas agrícolas e hortícolas. Para os autores, as espécies de *Fusarium* mais comumente relatadas de milho e de sorgo são *G.*

*moniliformis* e *G. thapsina*, respectivamente, e podem representar populações de patógenos agressivas e pelo menos parcialmente especializadas. Supõe-se que as mesmas tem sua origem na África, e que a introdução em diferentes áreas, mundialmente, carrega consigo as características de produção de toxinas.

Segundo Kelly et al. (2011), a podridão vermelha do caule é uma das maiores ameaças para produtores de sorgo na Austrália. Anteriormente *Fusarium moniliforme* era conhecido como agente causal, contudo, com mudanças na taxonomia, houve maior número de espécies fúngicas relacionadas a doença. O grupo de autores identificou as espécies de *Fusarium* associadas a podridão do caule em diversas regiões da Austrália, com uso de técnicas morfológicas e moleculares. O resultado obtido indicou que *Fusarium thapsinum* foi a espécie dominante em todas as regiões e em todas as plantas amostradas. Funnell-Harris et al. (2014), relatam que pedúnculos inoculados com *Fusarium thapsinum* resultaram em plantas com comprimento médio significativamente inferior.

Funnell-Harris et al. (2014), afirma que *F. thapsinum* é altamente específico para o sorgo, ao passo que as outras espécies do antigo complexo *Gibberella fujikuroi*, que inclui *F. proliferatum* e *F. verticillioides*, podem infectar múltiplas espécies. De acordo com o autor *F. thapsinum* pode ter se tornado tolerante a diferentes níveis de compostos fenólicos encontrados em sorgo, sugerindo que vários mecanismos de defesa podem estar envolvidos. Em 2016, Funnell-Harris et al., também identificaram suscetibilidade de cultivares de sorgo sacarino à inoculação de *Fusarium thapsinum*. Para Rajasab e Shabbir (2009), a espécie *Fusarium thapsinum*, distinguido recentemente de *F. moliniforme*, é o patógeno mais comum na cultura do sorgo, podendo estar relacionado a manchas em plântulas, podridão de raízes, colmos e grãos e produção de toxinas.

O'Donnel et al. (2000), relatam que nem todos os telemorfos das espécies de *Fusarium* da seção *Liseola* são conhecidos, necessitando assim do desenvolvimento de conceitos filogenéticos mais aprofundados das espécies, baseados em sequências de DNA. Estas espécies contidas na seção, além de serem patogênicas a diversas culturas agrícolas, também são altamente toxicogênicas, e podem produzir micotoxinas, tais como fumosininas, ácido fusárico, beauvericina, fusaproliferin e moniliformina.

De cinco espécies de *Fusarium* associadas às sementes de sorgo, *F. thapsinum* foi a mais virulenta em relação às mudas, seguida de *F. andiyazi*, então *F. verticillioides* e finalmente *F. nygamai* e *F. pseudonygamai* em trabalho realizado por Leslie e colaboradores (2005). Segundo os autores, todas as cinco espécies seriam identificadas como "*Fusarium moniliforme*", o que poderia explicar algumas das diferenças na patogenicidade e na produção de toxinas associadas a várias cepas coletadas sob esse nome. Azor et al. (2008), analisando isolados ditos como *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*), constatou que após identificação molecular, os mesmos foram identificados como *F. thapsinum*, confirmando a dificuldade no reconhecimento de algumas espécies.

A correta identificação desta espécie e a compreensão de ser um dos membros mais importantes do complexo possibilita as pesquisas para a identificação de hospedeiros resistentes.

Bandyopadhyay et al. (2002), também relata que *Gibberella fujukuroi* é um importante complexo de patógenos que infectam grãos de sorgo e apresentam uma grande diversidade genética. Segundo eles, sete das oito populações de acasalamento conhecidas, ou espécies biológicas, foram isoladas a partir de diferentes partes do sorgo, sendo a população de acasalamento F ou *Gibberella thapsina* a mais comum no sorgo.

De acordo com Porter et al. (2002), *Fusarium thapsinum* é uma espécie relativamente recente, com distribuição global, comumente isolada de colmos e sementes de sorgo. Os autores relatam ainda que esta espécie produz numerosas variações estruturais do ácido fusárico, podendo ser única para esta espécie de *Fusarium*.

Prom e Erpelding (2009), indicam que condições ambientais, como temperatura (25 a 35°C), alta umidade relativa (maior que 90%) e chuvas frequentes, especialmente na maturidade fisiológica e após, são os principais fatores que influenciam para o desenvolvimento da podridão dos grãos, ocasionada principalmente por *Fusarium thapsinum*, podendo resultar em perdas de produtividade, qualidade do grão e produção de toxinas. A alta umidade nas panículas durante a floração e o desenvolvimento do grão também contribuem para o desenvolvimento da doença. No trabalho desenvolvido pelos autores, o peso das

sementes e a germinação foram severamente afetados com a inoculação deste patógeno, apresentando porcentagens de germinação inferiores a 4%.

Prom (2004) relatou correlações negativas significativas entre a germinação de sementes com a incidência de *F. thapsinum* e *Curvularia lunata* isoladas de panículas de sorgo. Leyva-Madrigal et al. (2015), também identificou a presença de *F. thapsinum* em sementes de milho; o ensaio de patogenicidade demonstrou a capacidade desta espécie de colonizar os tecidos da epiderme e as células corticais adjacentes, sendo este o primeiro relato de *F. thapsinum* infectando milho no México.

Plantas de milho, sorgo e milheto inoculadas com os isolados de *F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum* desenvolveram lesões necróticas típicas de podridão de colmos no teste de patogenicidade (GUIMARÃES et al., 2016). Jardine e Leslie (1999), ao analisar a patogenicidade de isolados de *F. verticillioides* e *F. thapsinum* em colmos de híbridos de milho, verificaram que os isolados de *F. verticillioides* foram mais agressivos que os isolados de *F. thapsinum*. Estes resultados mostram que cultivos de milho, sorgo e milheto próximos um ao outro ou plantio alternado entre eles, pode aumentar o risco de ocorrência da podridão de colmo causada pelas espécies de *Fusarium* avaliadas nesse estudo, uma vez que a palhada dessas culturas pode servir como fonte de inóculo para as próximas culturas. É importante ressaltar que espécies de *Fusarium*, além de causar podridão de colmo, também infectam espigas e panículas onde podem produzir micotoxinas que são nocivas a saúde humana e animal (LESLIE et al., 2005). Guimarães et al. (2016), então conclui que para as espécies avaliadas (*F. andiyazi*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*) não existe especificidade de hospedeiro. Dessa forma a manutenção de inóculo no solo também poderá contribuir para o agravamento desse problema.

No trabalho desenvolvido por Melo (2014), *F. verticillioides* e *F. thapsinum* foram os patógenos que predominaram em espécies de *Brachiaria* no Brasil, sendo o primeiro relato destes associados ao gênero *Brachiaria*. Estas espécies, juntamente com *F. andiyazi*, são conhecidas por serem específicas dos gêneros *Sorghum* e *Penisetum* na África. Dessa forma, a presença de *F. thapsinum*, recorrente na África, comprova a citação anterior de que não existem barreiras



reprodutivas entre as populações, e evidencia que a abrangência de plantas hospedeiras, não sendo um patógeno restritivo a determinadas espécies.

Para Lazarotto (2013), a compreensão da dinâmica populacional e a variabilidade fúngica são aspectos importantes na avaliação da patogenicidade das espécies, buscando definir estratégias para o melhoramento genético, visando assim a resistência ao fitopatógeno. Além disso, a identificação genética e caracterização fiável de patógenos é necessário para a adequada gestão de doenças de plantas.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode se inferir as seguintes conclusões:

- BRS 509 apresenta qualidade fisiológica inferior às demais cultivares.
- Patógenos como *Fusarium* spp., *Aspergillus*, *Penicillium* spp., *Dreschelera* spp. e *Alternaria* spp. são encontrados associados a sementes de sorgo sacarino.
- O sequenciamento da região ITS e do gene fator de alongação 1- $\alpha$  identificou o patógeno *Fusarium thapsinum* associado à sementes de sorgo sacarino.
- *Fusarium thapsinum* é transmitido às sementes, sendo considerado patogênico à cultura e causando apodrecimento de sementes, tombamento e morte de plântulas em quatro cultivares de sorgo sacarino.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, K. A. et al. Desenvolvimento de mudas de alface a partir de sementes armazenadas e enriquecidas com micronutrientes e reguladores de crescimento. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 56-65, Sept./Oct. 2009.
- ALMODARES, A.; HADI, M. R. Production of bioethanol from sweet sorghum: a review. **African Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 4, n. 9, p. 772-780, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 25, n. 17, p. 3389-3402. 1997.
- AMARO, H. T. R. **Caracterização e padronização de testes para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de vinagreira**. 2010. 40p. Monografia (Curso de Engenharia Agrônoma). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba/MG, 2010.
- ARAÚJO, C. Evolução do sorgo sacarino para produção de etanol é viável. **EMBRAPA**. Brasília/DF, 18/out/2012, 2012.
- ARIF, M. et al. Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1□) gene. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 444-447, 2012.
- AZOR, M. et al. In vitro antifungal susceptibility and molecular characterizations of clinical isolates of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) and *Fusarium thapsinum*. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**. June 2008, vol. 52, n.6, p. 2228-2231. 2008.
- BALARDIN, C. R. et al. Possibilidade de transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, através da semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 574-581, 2005.
- BANDEIRA, A. H. et al. Desempenho de genótipos de sorgo sacarino cultivados em diferentes épocas de semeadura na região Central do Rio Grande do Sul. In: XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO: **Diversidade e inovações na era dos transgênicos**: resumos expandidos. Campinas: Instituto Agrônomo; Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, p. 2367–2371, 2012
- BANDYOPADHYAY, R. et al. Sorghum grain mold: through the 1990s into the New Millennium. In: Leslie J. F. (ed.), **Sorghum and Millets Diseases**. Iowa State Press, Ames, Iowa. pp. 173-185, 2002.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St Paul, Minnesota: APS Press, 1998. 218 p.

BARROCAS, E. N.. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas.** 2008. 122p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BRANCÃO, N. et al. **Ocorrência de fungos em sementes de sorgo, milho, soja e trigo.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado - Comunicado Técnico, n. 76, 3 p., 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395p.

CALONEGO, J. C.; ROSOLEM, C. A. Soybean root growth and yield in rotation with cover crops under chiseling and no-till. **European Journal of Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 242-249, Oct. 2010.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção.** 4.ed. Jaboticabal: Funep, 588p., 2000.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; MOREIRA, E. N. Transmissão de fungos em sementes de cereais de inverno e milho: implicações epidemiológicas. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária.** Viosa: UFV; DFP, 2005. p. 55-74.

CASTRILLON, M. A. S. et al. Resistência de genótipos de sorgo sacarino à mancha de ramulispóra foliar causada pelo fungo *Ramulispóra sorghi*, no Estado de Mato Grosso (Cáceres). In: XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2016, Bento Gonçalves/RS. **Anais...** Sete Lagoas: ABMS, 2016. p. 844-847.

CHEHRI, K. et al. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with head blight of wheat in Iran. **Pakistan Journal of Botany.** Karachi, v. 43, n. 5, p. 2607-2611, 2011.

COELHO, A.M, Fertilidade do solo exigências nutricionais e adubação do solo do sorgo sacarino. **Agroenergia em Revista.** p.18-19, Ano II, n. 3, 51 p, 2011.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2016/2017: terceiro levantamento: dezembro/2016.**

COTA, L. V. et al. **Doenças.** Sistema de produção, 2. 6º edição, set/2010. Embrapa Milho e Sorgo. Cultivo do Sorgo. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo\\_6\\_ed/doencas.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_6_ed/doencas.htm)>. Acesso em 07/07/2015.

COTA, L. V. Manejo integrado de doenças na cultura do sorgo. In: KARAM, D.; MAGALHÃES, P. C. (Ed.). **Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global.** Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014. cap. 32, p. 348-357.

COUTINHO, H. L. C. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.71, n.3, p.491-503, 1999.

CUNHA, S. P.; SEVERO FILHO, W. A.. Avanços tecnológicos na obtenção de etanol a partir de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 14, n. 2, p. 69-75, jul./dez. 2010.

DAN, E.L. et al. Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 9, n.3, p.45-55, 1987.

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

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Teste de vigor baseados na permeabilidade de membranas celulares: II Lixiviação de potássio. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 37-41, 1995.

DHINGRA, O. D. Prejuízos causados por microrganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 7, p. 139-145, 1985.

DINIZ, G. M. M. **Produção de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench): aspectos gerais**. 2010. Dissertação (Mestrado em Melhoramentos Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2010.

DIVAKARA, S. T. et al. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1132-1139, ISSN 0022-5142, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 1, 13 - 15, 1991.

DURÃES, F. O. M. Sorgo sacarino: desenvolvimento de tecnologia agrônômica. **Agroenergia em Revista**. Embrapa Agroenergia. Brasília, v. 3, agosto de 2011.

EMBRAPA - Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G –Tecnologia Qualidade Embrapa **Documentos 139** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 2012, 119 p, Agosto, 2012

EMBRAPA. Embrapa Milho e Sorgo – Sistemas de produção 2 cultivo de sorgo – Embrapa Milho e Sorgo – Clima – Versão Eletrônica. 7ª edição. Set./2011. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/> Acesso em: 7 de fevereiro de 2014.

EMBRAPA. Indicações técnicas para o cultivo de milho e sorgo no Rio Grande do Sul – safras 2013/2014 e 2014/2015. In: LVIII Reunião Técnica Anual de Milho e XLI Reunião Técnica Anual de Sorgo, Brasília/DF: Embrapa, 2013. 124p.

- EMYGDIO, B. M. et al., Avaliação de cultivares de sorgo sacarino para produção de etanol em dois ambientes contrastantes – safra 2012/2013. **Resumos...** In: 58<sup>o</sup> Reunião Técnica Anual do Milho, 41<sup>o</sup> Reunião Técnica Anual do Sorgo. Embrapa Clima Temperado. 2013.
- FARIA, V. Empresas defendem etanol de sorgo, apesar de baixa produção de 2012/2013. **Nova Cana**. 02/abr/2013. 2013.
- FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPACNPT, 1993. 128 p.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Minas Gerais, v.6, n. 2, p.36-41, 2008.
- FERREIRA, O. E. **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino com tratamento enzimático**. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.
- FIETZ, C. R. et al. Risco climático do consórcio milho com braquiária em Mato Grosso do Sul. In: CECCON, G. (Ed.). **Consórcio milho-braquiária**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 89-112.
- FLÁVIO, N. S. D. S. et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 7-20, jan./fev. 2014
- FRANCO, A. Compensa investir em sorgo para fazer etanol? **Jornal Cana**. 17/mar/2015. 2015.
- FREITAS, R. A. Deterioração e armazenamento de sementes de hortaliças. In: NASCIMENTO, W.M. (Ed.). **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa hortaliças, 2009. p.155-184.
- FRIGERI, T. **Interferência de patógenos nos resultados dos testes de vigor em sementes de feijoeiro**. 2007. 77p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, maio/jun. 2000.
- FUNNELL-HARRIS, D. L. et al. Alteration in Lignin Biosynthesis Restricts Growth of *Fusarium* spp. in Brown Midrib Sorghum. **Phytopathology**, Jul 2010, Volume 100, Number 7, 671-681, 2010
- FUNNELL-HARRIS, D. L. et al. Effect of waxy (low amylose) on fungal infection of sorghum grain. **Phytopathology**. v. 105 p.786-796. 2015.
- FUNNELL-HARRIS, D. L. et al. Response of *Fusarium thapsinum* to sorghum *brown midrib* lines and to phenolic metabolites. **Plant Disease**. 98:1300-1308, 2014.

FUNNELL-HARRIS, D. L. et al. Response of Sweet Sorghum Lines to Stalk Pathogens *Fusarium thapsinum* and *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, May, Volume 100, Number 5, Pages 896-903, 2016.

GARCIA JÚNIOR, D. ***Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.)**: detecção, efeitos e controle. 2006. 78 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo – SP, 2006.

GARCIA, R. A.; SUTIER, G. A. S. **Alelopatia de sorgo-sacarino na soja cultivada em sucessão**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1679-0456;74, Dourados, MS, p. 28, 2016.

GARUD, T. B., ISMAIL, S., SHINDE, B. M. Effect of two mold-causing fungi on germination of sorghum seed. **International Sorghum and Millets Newsletter** 41:54. 2000.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004.

GEISER, D. M. et al. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, 103:400-408, 2013.

GENTILE, A. et al. Origin, divergence and phylogeny of epichloe endophytes of native Argentine grasses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 35, n. 1, p. 196-208, 2005.

GLYNN, N. C. et al. Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties *majus* and *nivale* to species status. **Mycological Research**, Manchester, v. 109, n. 8, p. 872-880, 2005.

GOMES, A.; RODRIGUES, D.; OLIVEIRA, P. Caracterização do sorgo para a produção de etanol. **Agroenergia em revista**, ano 2, n. 3, p. 26, 2011.

GONÇALVES, R. M. et al. Identificação molecular de fungos isolados de lesões necróticas de mancha branca do milho. **Tropical Plant Pathology** 36 (Suplemento), XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Bento Gonçalves RS, 2011.

GUEDES, R. S. et al. Resposta fisiológica de sementes de *Erythrina velutina* Willd. ao envelhecimento acelerado. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 323-330, 2009.

GUIMARÃES, E. A. et al. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* em colmos milho, sorgo e milheto. In: XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2016, Bento Gonçalves/RS. **Anais...** Sete Lagoas: ABMS, 2016. p. 826-829.

GUSTAFSON, D. J. et al. Competitive relationships of *Andropogon gerardii* (Big Bluestem) from remnant and restored native populations and select cultivated varieties. **Funct. Ecol.**, v. 18, n. 3, p. 451-457, 2004.

HAEGI, A. et al. A newly developed real-time PCR assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* and its use in compatible and incompatible interactions with grafted melon genotypes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 8, p. 802-810, Aug. 2013.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [S.l.], v. 41, n. 41 p. 95-98. 1999.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 6th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 770p.

HELDWEIN, A. B.; BURIOL, G. A.; STRECK, N. A. O clima de Santa Maria, RS. **Ciência & Ambiente**, v. 38, p. 43-58, 2009.

HÖFS, A. et al. Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta à qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.26, n.1, p.92-97, 2004.

IBRAHIM, A.E. et al. Accelerated aging techniques for evaluating sorghum seed vigor. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, v.17, n.1, p.29-37, 1993.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:  
<<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>. Acesso em 01/03/2017.

INSTRUÇÃO NORMATIVA, N.45, de 17 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, seção 1, n. 181, p. 6- 36. 2013.

JARDINE, D. J.; LESLIE, J. F. Aggressiveness to mature maize plants of *Fusarium* strains differing in ability to produce fumonisin. **Plant Disease**, v. 83, n. 7, p. 690-693, 1999.

KELLY, L. et al. *Fusarium thapsinum* is the dominant species associated with sorghum stalk rot in Queensland and northern New South Wales. In: **4th Asian Conference on Plant Pathology and the 18th Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference (ACPP/APPS 2011)**: New Frontiers in Plant Pathology for Asia and Oceania, 26-29 Apr 2011, Darwin, Australia. 2011.

KLINK, U. **Melhoramento genético do sorgo para a produção de etanol**. Pelotas - RS, 2010. Disponível em:  
<[http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/simposio\\_agroenergia/palestras/11\\_quarta/Manha/Urubatan%20Klink/Microsoft%20PowerPoint%20-%202010%20simposio%20de%20bioenergia%20pelotas%20rs\\_urubatan%20klink.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/simposio_agroenergia/palestras/11_quarta/Manha/Urubatan%20Klink/Microsoft%20PowerPoint%20-%202010%20simposio%20de%20bioenergia%20pelotas%20rs_urubatan%20klink.pdf)>. Acesso em: 01/03/2017.



- KLITTICH, C. J. R. et al. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A New Species in Section Liseola from Sorghum. **Mycologia**, Vol. 89, No. 4 (Jul. - Aug., 1997), pp. 643-652, 1997.
- KRISTENSEN, R. et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycological Research**, Manchester, v. 109, p. 173–186, 2005.
- KUMARAE, E. E.; SOUZA, N. L. Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. *sp. lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1481-1485, 2002.
- LARENA, I. et al. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**. v.75, p. 187-194. 1999.
- LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados à *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul.** 2013. 156 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.
- LESLIE, J. F. et al. Species Diversity of and Toxin Production by *Gibberella fujikuroi* Species Complex Strains Isolated from Native Prairie Grasses in Kansas. **Appl Environ Microbiol.** 2004 Apr; 70(4): 2254–2262, 2004.
- LESLIE, J. F. et al. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. **Phytopathology**, 95:275-283, 2005.
- LEYVA-MADRIGAL, K. Y. et al. *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* Species Complex involved in mixed infections of maize in Northern Sinaloa, Mexico. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 6, p. 486-497, 2015.
- LIMA, A. A. et al. Identificação molecular de isolados de fungos de interesse médico por meio de marcadores RAPD. **Revista Universitas: Ciências da Saúde**. V. 8, n. 2, 2010.
- LOPES, M. F. Q. et al. Influência da densidade de plantio em sementes de duas cultivares de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). In: XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2016, Bento Gonçalves/RS. **Anais...** Sete Lagoas: ABMS, 2016. p. 1892-1896.
- MACHADO, A. Q.; CASSETARI NETO, D.; GUERRA, W. D. **Distribuição, transmissibilidade e controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro no estado do Mato Grosso.** Relatório técnico do projeto de pesquisa. Centro Universitário UNIVAG, Várzea Grande, 2005.
- MACIEL, C. G. **Patógenos em sementes de *Pinus* spp. – ênfase em *Lasiodiplodia* sp. e *Fusarium* spp.** 73 f. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

MACIEL, K. S. et al. Qualidade fisiológica de sementes de tomate. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 44, p. 819-826, 2012.

MAEDA, J. A.; SAWAZAKI, E. Fatores que afetam a qualidade de sementes de sorgo: cultivares e localidades. **Bragantia**, v. 41, n. 10, 1982.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; RODRIGUES, J. A. S. - Embrapa Milho e Sorgo - **Sistemas de produção**, Cultivo de sorgo - Embrapa Milho e Sorgo – Ecofisiologia – Versão eletrônica 4ª edição. Set. 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/> Acesso em 05 de julho 2015.

MAGALHÃES, R. T. et al. Produção e composição bromatológica de vinte e cinco genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v, 62, n. 3, p.747-751, 2010.

MAGCULIA, N. J. F.; CUMAGUN, C. J. R.. Genetic diversity and PCR-based identification of potential fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* isolates infecting corn in the Philippines. **Trop. plant pathol.**, Brasília , v. 36, n. 4, p. 225-232, Aug. 2011

MAGNANI, M., et al. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Sci. Agric.* 2005, 62(1), 45-49.

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

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba-SP: Fealq, 2005. 495 p.

MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientiae agrícola**. Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 363-374, Aug. 2015.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.3.1-3.24.

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

MARTÍNEZ-RAMÍREZ, J. L. et al. Aspectos epidemiológicos de *Fusarium moniliforme* causante del tizón de la panoja del sorgo **Avances en Investigación Agropecuaria**, vol. 9, núm. 3, septiembre, 2005, pp. 11-18, 2005.

MARTINS NETTO, D. A. et al. Qualidade Fisiológica e sanitária de sementes de sorgo danificadas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 20, n. 2, p. 134-140, 1998.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Piracicaba, 124f. 2005.

- MAY, A. Boas práticas agrícolas para o cultivo de sorgo. **Agroenergia em Revista**. Embrapa Agroenergia. Brasília, v. 3, agosto de 2011a.
- MAY, A. Sistemas de produção de sorgo sacarino: aspectos bióticos, abióticos e arranjos produtivos. I Seminário Temático sobre Sorgo Sacarino – **Anais...** Sete Lagoas, MG, 2011b.
- MAY, A. et al. **Cultivares de sorgo para o mercado brasileiro na safra 2011/2012**. Documentos/Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 28p., 2011
- MAY, A. et al. **Cultivo de Sorgo Sacarino em Áreas de Reforma de Canaviais**. Circular Técnica, n. 186. Embrapa. Sete Lagoas/MG, 2013.
- MAY, A. et al. Variedades de sorgo sacarino em diferentes espaçamentos e população de plantas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.3, p. 278-290, 2012.
- MELO, M. P. **Detecção de espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de microtoxinas em grãos de milho no Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife/PE, 2011. 63f.
- MELO, M. P. **Espécies biológicas e filogenéticas do completo *Fusarium fujikuroi***. 2014. 131 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- MENEZES, J. P. et al. Variabilidade genética na região seu fazer rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemii*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v 34, n. 1, fevereiro de 2010
- MICHEREFF, S. J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005., p. 1-18.
- MILANESI, P. M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema de plantio direto**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- MILOSEVIC, M. et al. Vigour tests as indicators of seed viability. **Genetika**, 42(1):103–118, 2010.
- MOON, C. D. et al. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes grasses. **Molecular Ecology**, British Columbia, v. 13, n. 6, p. 1455-1467, 2004.
- MUNIZ, M.F.B; PORTO, M.D.M. Presença de *Alternaria* spp. em diferentes partes da semente de cenoura e em resíduos culturais e efeito do tratamento de sementes na sua transmissão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 187-193, 1999.

- MUNIZZI, A. et al. Qualidade de sementes de quatro cultivares de soja, colhidas em dois locais no estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.176-185, 2010.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.2.1-2-24.
- NEEGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, 1979. v.1., 829 p.
- NOVAIS, C. B. et al. Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 886-896, 2010.
- NUNES, S. C. P. **Produção e qualidade de sementes de sorgo sacarino em diferentes arranjos na Região Central do Rio Grande do Sul**. 2015. 76 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- O'DONNELL, K. et al. A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujykuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v. 41, p. 61-78, 2000.
- OKI, T.; O'DONNELL, K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognised as the Group 1 population of *F. graminearum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 91, n. 4, p. 597–609, 1999.
- OLIVEIRA, J. A. et al. Secagem e armazenamento de sementes de sorgo com alto e baixo teor de tanino. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4 p. 699-710, 2011.
- OLIVEIRA, M. et al. Main airborne Ascomycota spores: characterization by culture, spore morphology, ribosomal DNA sequences and enzymatic analysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 4, p. 1171-1181, 2010.
- PANIZZI, R.C.; FERNANDES, N.G. Doenças do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Camargo, E.A., Rezende, J.A.M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas**. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1997. v. 2, pp.676-689.
- PARRELLA, M. N. D.; PARRELLA, R. A. C. Produção de sementes de sorgo sacarino. **Agroenergia em Revista**. Embrapa Agroenergia. Brasília, v. 3, agosto de 2011.
- PARRELLA, R. A. C. et al. BRS 509 – Variedade de sorgo sacarino para produção de etanol. **Comunicado Técnico**. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011.
- PARRELLA, R. A. C. Melhoramento genético do sorgo sacarino. **Agroenergia em Revista**. Embrapa Agroenergia. Brasília, v. 3, agosto de 2011.

PARRELLA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E. **Cultivares**. IN: MAY, A. et al. Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 139). p. 14-22.

PEREIRA FILHO, I. A. et al. Avaliação de cultivares de sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] em diferentes densidades de semeadura visando a obtenção de etanol. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, p.118-127, 2012.

PEREIRA, C. E. et al. Desempenho de sementes de soja tratadas com fungicidas e peliculizadas durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 656-665, maio/jun., 2007.

PERES, W. L. R. **Testes de vigor em sementes de milho**. 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010, 50f.

PESKE, S.; ROSENTHAL, M; ROTA G. (Ed.) **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: UFPel, 2003. 321pg.

PINHEIRO, M.R.R. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* com base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha-decaju**. 2004. 149p. (Dissertação Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, DF. 2004.

PINTO, N. F. J. de A. Avaliação da eficiência dos fungicidas fludioxonil + metalaxyl-M no tratamento de sementes de sorgo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 453-456, 2004.

PINTO, N. F. J. de A. **Controle químico das principais doenças da cultura do sorgo**. In: Simpósio de controle de doenças de plantas, 2006, Lavras. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/59942/1/Controle-quimico-1.pdf>. acesso em 20 de outubro de 2013.

PINTO, N. F. J. de A. **Patologia de sementes de sorgo**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1999. 62p.

PORTER, J. K. et al. Mycotoxins from fungal-infected sorghum: *Claviceps*, *Fusarium* and the *Striga* Connection. In: Leslie J. F. (ed.), **Sorghum and Millets Diseases**. Iowa State Press, Ames, Iowa. pp. 229-237. 2002

PRASAD, S. et al. Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India. **Energy and Fuels**, Washington, v. 21, p. 2415-2420, 2007.

PROM, L. K. et al. Response of eight sorghum cultivars inoculated with *Fusarium thapsinum*, *Curvularia lunata*, and a mixture of the two fungi. **Crop Protection**, Volume 22, Issue 4, May 2003, Pages 623–628.

PROM, L. K. The effects of *Fusarium thapsinum*, *Curvularia lunata* and their combination on sorghum germination and seed mycoflora. **Journal New Seeds**, 6: 39-49. 2004.

PROM, L. K.; ERPELDING, J. E. New sources of grain mold resistance among sorghum accessions from Sudan. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, vol. 10, núm. 3, septiembre-diciembre, 2009, pp. 457-463, 2009

QUEIROZ, G.M. **Germinação, vigor e capacidade de armazenamento de semente de sorgo granífero, *Sorghum bicolor* (L.) Moench**. 1979. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1979.

RAJASAB A. H.; SHABBIR, S. M. Identity and toxigenic potentiality of *Fusarium* spp. colonizing *Sorghum*. In: **Frontiers in Fungal Ecology, Diversity and Metabolites**. Ed Sridhar, KR. IK International Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi. pp, 248-263. 2009.

REDDY, B. V. et al. Sweet sorghum- a potential alternate raw material for bio-ethanol and bio-energy. **Sorghum Millets Newsletter**. Patancheru, v.46, p.79-86, 2005.

REDDY, B. V. S; REDDY, P. S. Sweet Sorghum: Characteristics and Potential. International Sorghum and Millets. **Newsletter. Índia**, v.44, p.26-28, 2003.

REHNER, S. A., BUCKLEY, E. A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, [S.l.], v. 97, n. x, p. 84– 98, 2005.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. **Documentos**, Embrapa Cerrados-Planaltina, DF, 33p., 2002.

REVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 87, n. 3, p. 899-911, jul. 2010.

RIBAS, P. M. Cultivo do Sorgo - Importância econômica. **Sistemas de produção**, 2, Embrapa Milho e Sorgo, Versão eletrônica. 4ª edição. Set./2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/> Acesso em: 10 de julho de 2015.

RIBEIRO, C. B. et al. Fermentação alcoólica do caldo da cana: parâmetros operacionais de resposta no processo. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, Florianópolis, n. esp, p.465-472, dez. 2015.

SACHS, C. et al. Incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho e transmissão para o sistema radicular e parte aérea da planta. XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo. **Anais...Águas de Lindóia**, 2012.

SANTOS, G. S. **Concorrência ampliada dos produtos do sorgo sacarino na entressafra da cana-de-açúcar no Brasil**. Embrapa. Disponível em [http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2011/GILMAR\\_SANTOS%20SORGO%20ACARINO\\_V5.pdf](http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2011/GILMAR_SANTOS%20SORGO%20ACARINO_V5.pdf). Acesso em 19 de outubro de 2013.

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 456-458, 2004.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 1-6, 2012.

SCHROERS, H. J. et al. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. **Mycologia**, [S.l.], v. 101, n. 1, p. 44–70, 2009.

SHARFUN-NAHAR, M.; MUSHTAQ, M. Pathogenecity and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species sec. *Liseola* and *Sporotrichiella* in sunfloer. **Pakistan Journal of Botany**. 38:487-492. 2006.

SORDI, R. A. Sorgo sacarino para produção de etanol: uma visão do produtor e da usina de cana-de-açúcar. **Agroenergia em Revista**, ano 2, n. 3, p. 31-32, ago. 2011.

SOUSA, M. V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, vol. 33, 1, 041-048, 2008.

SOUZA, A. E.F.; ARAUJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 465-471, Dec. 2007.

SOUZA, M. V. **Transmission, colonization and molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* in common bean seed**. 2013. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 596-1599, 2007.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetic and Biology**, n. 31, p. 21-32, 2000.

ULLMANN, Renan et al. Qualidade fisiológica das sementes de sorgo sacarino submetidas à secagem em diferentes condições de ar. **Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental**, Campina Grande , v. 19, n. 1, p. 64-69, Jan. 2015.

VANT'KLOOSTER, J. W. et al. *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation fator 1 alpha. **Gene** 249, 145-151, 2000.

VENDRUSCOLO, T. P. S. et al. Incidência de fungos em sementes de sorgo biomassa em pós-colheita. In: XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2016, Bento Gonçalves/RS. **Anais...** Sete Lagoas: ABMS, 2016. p. 795-798

WAALWIJK, C. et al. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from Sections Elegans, Liseola and Dlamina based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. **Mycologia**, [S.l.], v. 88, n. 3, p. 361-368, 1996.

WALKER, C. et al. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, p. 463-473, abr.-jun., 2016.

YAGO, J. I. et al. The Effect of Seed-borne Mycoflora from Sorghum and Foxtail Millet Seeds on Germination and Disease Transmission. **Mycobiology**. 2011 Sep; 39(3): 206–218.



## **ANEXOS**

## **ANEXO A – DESCRIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA**

### **Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)**

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g de dextrose;
- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434p.

### **Meio de cultura Ágar-água (AA)**

- 17 g de Ágar;
- 1 L de água destilada.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434p.

## ANEXO B – RESUMO DA ANOVA REFERENTE À TABELA 1

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Variável analisada: PC\_TRA5

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	457.906440	152.635480	2.152	0.1073
erro	44	3120.848608	70.928377		
Total corrigido	47	3578.755048			
CV (%) =	42.71				
Média geral:	19.7189583	Número de observações:	48		

Variável analisada: GER\_TRANS

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	1376.884583	458.961528	9.452	0.0000
erro	44	2136.401817	48.554587		
Total corrigido	47	3513.286400			
CV (%) =	11.53				
Média geral:	60.4100000	Número de observações:	48		

Variável analisada: NA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	57.666667	19.222222	0.746	0.5306
erro	44	1134.000000	25.772727		
Total corrigido	47	1191.666667			
CV (%) =	62.80				
Média geral:	8.0833333	Número de observações:	48		

Variável analisada: MOR

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	1966.000000	655.333333	12.439	0.0000
erro	44	2318.000000	52.681818		
Total corrigido	47	4284.000000			
CV (%) =	46.83				
Média geral:	15.5000000	Número de observações:	48		

Variável analisada: C\_PA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	4.005490	1.335163	3.486	0.0235
erro	44	16.853558	0.383035		
Total corrigido	47	20.859048			
CV (%) =	16.69				
Média geral:	3.7077083	Número de observações:	48		

Continua ...

Variável analisada: C\_RA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	4.438856	1.479619	2.464	0.0748
erro	44	26.421275	0.600484		
Total corrigido	47	30.860131			
CV (%) =	12.60				
Média geral:	6.1518750	Número de observações:		48	

Variável analisada: C\_TO

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	16.347408	5.449136	3.850	0.0157
erro	44	62.274983	1.415341		
Total corrigido	47	78.622392			
CV (%) =	12.07				
Média geral:	9.8595833	Número de observações:		48	

Variável analisada: MS\_GERM\_

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.001860	0.000620	3.334	0.0278
erro	44	0.008183	0.000186		
Total corrigido	47	0.010043			
CV (%) =	42.10				
Média geral:	0.0323958	Número de observações:		48	

Variável analisada: ENV\_ACEL\_T

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	400404183.530556	133468061.176852	3.860	0.0155
erro	44	1.521541816E+0009	34580495.817113		
Total corrigido	47	1.921945999E+0009			
CV (%) =	21.67				
Média geral:	27135.3172917	Número de observações:		48	

Variável analisada: IVE

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	2.904923	0.968308	5.095	0.0041
erro	44	8.361925	0.190044		
Total corrigido	47	11.266848			
CV (%) =	10.10				
Média geral:	4.3177083	Número de observações:		48	

Continua ...

Variável analisada: C\_PA\_DA\_E

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	262.534875	87.511625	32.532	0.0000
erro	44	118.361717	2.690039		
Total corrigido	47	380.896592			
CV (%) =	13.00				
Média geral:	12.6129167	Número de observações:		48	

Variável analisada: MS\_PA\_EMER

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.000322	0.000107	6.621	0.0009
erro	44	0.000712	0.000016		
Total corrigido	47	0.001034			
CV (%) =	28.32				
Média geral:	0.0142083	Número de observações:		48	

Variável analisada: EMERG\_

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.223706	0.074569	5.409	0.0029
erro	44	0.606592	0.013786		
Total corrigido	47	0.830298			
CV (%) =	9.60				
Média geral:	1.2235417	Número de observações:		48	

## ANEXO C – RESUMO DA ANOVA REFERENTE À TABELA 2

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Variável analisada: Sementes totais infestadas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.511692	0.170564	2.811	0.0503
erro	44	2.670100	0.060684		
Total corrigido	47	3.181792			
CV (%) =	21.66				
Média geral:	1.1370833	Número de observações:		48	

Variável analisada: FUSARIUM

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.041056	0.013685	0.584	0.6289
erro	44	1.031842	0.023451		
Total corrigido	47	1.072898			
CV (%) =	16.71				
Média geral:	0.9164583	Número de observações:		48	

Variável analisada: alternaria

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.702092	0.234031	7.379	0.0004
erro	44	1.395433	0.031714		
Total corrigido	47	2.097525			
CV (%) =	38.82				
Média geral:	0.4587500	Número de observações:		48	

Variável analisada: ASPERGILLU

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.137640	0.045880	4.706	0.0062
erro	44	0.428942	0.009749		
Total corrigido	47	0.566581			
CV (%) =	85.39				
Média geral:	0.1156250	Número de observações:		48	

Variável analisada: DRESCHELER

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.341150	0.113717	9.307	0.0001
erro	44	0.537617	0.012219		
Total corrigido	47	0.878767			
CV (%) =	52.85				
Média geral:	0.2091667	Número de observações:		48	

Continua ...

Variável analisada: PENIC\_

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.031633	0.010544	1.751	0.1705
erro	44	0.264967	0.006022		
Total corrigido	47	0.296600			
CV (%) =	81.69				
Média geral:	0.0950000	Número de observações:		48	

Variável analisada: EPICOCUM

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.341150	0.113717	9.307	0.0001
erro	44	0.537617	0.012219		
Total corrigido	47	0.878767			
CV (%) =	52.85				
Média geral:	0.2091667	Número de observações:		48	

## ANEXO D – RESUMO DA ANOVA REFERENTE À TABELA 3

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Variável analisada: PATOGENOCInormais

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.461456	0.153819	40.168	0.0000
erro	44	0.168492	0.003829		
Total corrigido	47	0.629948			
CV (%) =	5.51				
Média geral:	1.1239583	Número de observações:	48		

Variável analisada: PATOGENOC2 com sintomas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	3	0.464375	0.154792	40.698	0.0000
erro	44	0.167350	0.003803		
Total corrigido	47	0.631725			
CV (%) =	13.82				
Média geral:	0.4462500	Número de observações:	48		



## ANEXO E – RESUMO DA ANOVA REFERENTE À TABELA 4

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Variável analisada: PLANT\_NORM

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
A	3	0.244065	0.081355	17.036	0.0000
D	3	0.293211	0.097737	20.467	0.0000
A*D	9	0.434475	0.048275	10.109	0.0000
erro	176	0.840479	0.004775		
Total corrigido	191	1.812230			
CV (%) =	6.33				
Média geral:	1.0909479	Número de observações:	192		

Variável analisada: PLANT\_SINT

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
A	3	0.111121	0.037040	3.250	0.0231
D	3	0.174190	0.058063	5.095	0.0021
A*D	9	0.550710	0.061190	5.369	0.0000
erro	176	2.005752	0.011396		
Total corrigido	191	2.841773			
CV (%) =	96.72				
Média geral:	0.1103786	Número de observações:	192		

Variável analisada: PLANT\_MORT

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
A	3	0.094131	0.031377	3.164	0.0259
D	3	0.302983	0.100994	10.183	0.0000
A*D	9	0.319062	0.035451	3.575	0.0004
erro	176	1.745523	0.009918		
Total corrigido	191	2.461699			
CV (%) =	86.00				
Média geral:	0.1157948	Número de observações:	192		

Variável analisada: SEMENTES\_M

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
A	3	0.260642	0.086881	22.433	0.0000
D	3	0.083209	0.027736	7.162	0.0001
A*D	9	0.146190	0.016243	4.194	0.0001
erro	176	0.681630	0.003873		
Total corrigido	191	1.171671			
CV (%) =	15.00				
Média geral:	0.4149380	Número de observações:	192		