

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no  
Brasil: identificação, patogenicidade e controle**

**Thaïs Dias Martins**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia

**Piracicaba**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Thaís Dias Martins  
Engenheiro Agrônomo

**Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no Brasil:  
identificação, patogenicidade e controle**

Orientador:

Prof. Dr. **JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia

**Piracicaba**

**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Martins, Thaís Dias

Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no Brasil: identificação, patogenicidade e controle / Thaís Dias Martins. - - Piracicaba, 2006.  
102 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.  
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Fitotoxicidade 3. Fungicidas 4. Fungos fitopatogênicos –  
Identificação 5. Patogenicidade 6. Sementes I. Título

CDD 633.61

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

A Deus por dar sentido a todos os passos de minha vida,

**Agradeço.**

À minha mãe, Tércia, por toda sua dedicação, ensinamentos, responsabilidade e amor que me permitiram alcançar mais esta conquista;

Ao meu querido namorado, Francisco, pela amizade e carinho que facilitam a minha caminhada;

À Lila, minha cachorrinha, pelos momentos de bagunça e pela companhia na cadeira ao lado da qual eu escrevi esta dissertação;

**Ofereço**

**Dedico** ao Prof. Hiroshi Kimati (*in memoriam*), que sempre esteve presente durante o desenvolvimento deste estudo e que muito me ensinou com sua simplicidade e genialidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Otávio Machado Menten, pela oportunidade de realização deste estudo, orientação e estímulo.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira-CTC – pela permissão para realizar este trabalho. Espero que os resultados obtidos neste estudo possam ser úteis no processo de melhoramento da cana-de-açúcar.

Ao Dr. Álvaro Sanguino, pela disponibilidade, alegria e condições excelentes que propiciaram o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Dr. José Antônio Bressiani pela amizade e colaboração.

Ao Prof. Paulo Sentelhas pela orientação com os dados climáticos.

À Profa. Sônia Maria de S. Piedade pela amizade e ajuda na interpretação das análises estatísticas.

Ao meu antigo orientador, e hoje amigo, Alfredo Seiiti Urashima, pela torcida, apoio e ensinamentos em todos os momentos profissionais importantes da minha vida.

Ao Prof. Ludwig H. Pfenning pela identificação de espécies fúngicas.

Aos colegas do departamento de Fitopatologia da ESALQ, em especial, à minha amiga Cassiara, com a qual constituí uma equipe de trabalho há quase oito anos.

Aos funcionários do Laboratório Geral da Fitopatologia da ESALQ, Fernanda e Rodolfo, pela amizade e orientação.

Aos secretários do departamento de Fitopatologia da ESALQ, Jeferson e Linda, pela amizade e pela alegria.

À secretária do setor de Fitopatologia do CTC, Georgete Negri, pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Patologia de Sementes da ESALQ, Adriana Grandis (Dridra), Alderi Emídio de Araújo, Alessandra Rabalho (Lêla), Annelise Tremoldi (Anne), Cristiane Gravena (Cris), Cândido Ataíde Sobrinho, DiogoTogni (Didi), Guilherme Moro (Mouro), Heloísa Duarte de Moraes (Helô), Laura de Castro Assumpção (Lauret's), Luana Botelho (Lula), minha querida afilhada Tathiana Lisboa (pequena t) e Vanessa Cristina Frare (VC Frare), pelo apoio, pelos ensinamentos e

presença em todos os momentos pessoais e profissionais desses anos de mestrado. Vocês foram e são fundamentais!

À minha família, que me estimula e dá grandes exemplos profissionais e pessoais: Pai, Laís, Cacau, Helena, Marcos, Tita, Cé, Tia Sandra, Tio Aziz, Ana Beatriz, Ana Laura, Mariana, Sr. Francisco, Dona Valquiria, Didiu, Brumas, Tia Muru, Tia Lena, Tia Beth, entre outros.

A todos os professores e demais funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ e do Laboratório de Fitopatologia do CTC pelo bom convívio, em especial Edivaldo e Sandra (ESALQ), Dona Lourdes e Cidinha (CTC).

Às bibliotecárias Eliana e Silvia pela revisão das referências deste estudo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

“Os amores na mente, as flores no chão,  
A certeza na frente, a história na mão,  
Caminhando e cantando e seguindo a canção,  
Aprendendo e ensinando uma nova lição “.

Geraldo Vandré

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	12
LISTA DE FIGURAS .....	14
LISTA DE TABELAS .....	17
1 INTRODUÇÃO .....	20
Referências .....	21
2 FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES (CARIOPSES) DE CANA-DE-AÇÚCAR: MÉTODOS PARA DETECÇÃO, INCIDÊNCIA E RELAÇÃO ENTRE INCIDÊNCIA FÚNGICA E AMBIENTE DE PRODUÇÃO DAS SEMENTES .....	22
Resumo .....	22
Abstract .....	23
2.1 Introdução .....	24
2.2 Material e Métodos.....	28
2.2.1 Verificação do método mais adequado para detecção e identificação de fungos associados às sementes (cariopses) de cana-de-açúcar.....	28
2.2.2 Levantamento dos fungos associados e da incidência em sementes de cana-de-açúcar provenientes dos programas de melhoramento dos anos de 2002, 2003 e 2004 e relação entre a incidência fúngica e o ambiente onde foram produzidas.....	30
2.2.3 Isolamento dos fungos freqüentemente associados às sementes de cana-de-açúcar .....	32
2.3 Resultados e Discussão.....	33
2.3.1 Verificação do método mais adequado para detecção de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar .....	33
2.3.2 Levantamento dos fungos associados e da incidência em sementes de cana-de-açúcar provenientes dos programas de melhoramento nos anos de 2002, 2003 e 2004 e relação entre a incidência fúngica e o ambiente onde foram produzidas.....	40
2.4 Conclusões.....	44
Referências .....	45
3 EFEITOS DE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR ...	48

Resumo .....	48
Abstract .....	48
3.1 Introdução .....	49
3.2 Material e Métodos .....	50
3.3 Resultados e Discussão .....	51
3.4 Conclusões .....	56
Referências .....	56
4 PATOGENICIDADE DOS FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR E SINTOMAS CAUSADOS .....	58
Resumo .....	58
Abstract .....	58
4.1 Introdução .....	59
4.2 Material e Métodos .....	61
4.3 Resultados e Discussão .....	63
4.4 Conclusões .....	66
Referências .....	67
5 CONTROLE DE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DE FUNGICIDAS .....	68
Resumo .....	68
Abstract .....	68
5.1 Introdução .....	69
5.2 Material e Métodos .....	72
5.2.1 Fungitoxicidade <i>in vitro</i> .....	72
5.2.2 Fitotoxicidade de fungicidas às sementes/ plântulas de cana-de-açúcar .....	76
5.2.3 Validação do tratamento químico na sementeira .....	78
5.3 Resultados e Discussão .....	79
5.3.1 Fungitoxicidade <i>in vitro</i> .....	79
5.3.2 Fitotoxicidade de fungicidas às sementes/ plântulas de cana-de-açúcar .....	91
5.3.3 Validação do tratamento químico na sementeira .....	93
5.4 Conclusões .....	94
Referências .....	94

6 CONCLUSÕES FINAIS.....	97
REFERÊNCIAS.....	100

## RESUMO

### Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no Brasil: identificação, patogenicidade e controle.

Este estudo teve como objetivos: investigar o método mais adequado para detecção de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar; fazer o levantamento dos fungos associados às sementes e incidência; correlacionar a incidência fúngica nessas sementes e o ambiente onde foram produzidas; efeitos que fungos associados às sementes têm em sementes e plântulas; patogenicidade dos fungos mais freqüentes e sintomas que podem causar; determinar a sensibilidade dos principais fungos a fungicidas; determinar a fitotoxicidade de sementes e plântulas a fungicidas e propor o tratamento fungicida mais adequado para produção de plântulas vigorosas, sem sintomas, para os programas de melhoramento. Para avaliar o método mais adequado de detecção dos fungos, realizaram-se análises sanitárias utilizando combinações entre recipientes, substratos e regimes de luz. Para levantamento dos fungos associados e da incidência em sementes, realizaram-se análises sanitárias das sementes de 29 amostras e as incidências fúngicas obtidas foram comparadas com os dados climáticos do local onde foram produzidas as sementes. Os possíveis efeitos dos fungos às sementes e plântulas foram estudados por testes de sanidade e germinação de sementes, observando-se quais condições se apresentavam as sementes e plântulas que haviam incidência fúngica. A patogenicidade dos fungos, encontrados com maior freqüência, foi avaliada por inoculação de sementes através do contato com cultura em meio colonizado pelo fungo, posterior distribuição das sementes em substrato estéril e avaliação da emergência de plântulas e total de plântulas com sintomas e tipos de sintomas. Por meio de ensaios de fungitoxicidade *in vitro*, estudou-se a sensibilidade dos fungos, mais freqüentemente detectados em sementes, a nove fungicidas nas doses de 1, 10 e 100 ppm e determinação da ED<sub>50</sub>. Os fungicidas mais eficientes foram avaliados, *in vivo*, quanto a sua fitotoxicidade por meio da pulverização, em diferentes doses, em sementes distribuídas em substrato estéril. Foram avaliados: emergência, altura da parte aérea e comprimento da raiz das plântulas, total de plântulas com sintomas de fitotoxicidade e outros tipos de sintomas. Ao final, realizou-se validação, pulverizando-se o fungicida eficiente *in vitro* e não fitotóxico em sementes de cana-de-açúcar. Os resultados encontrados foram: a) o método escolhido para realização das análises sanitárias foi o de placas de Petri de plástico com papel de filtro como substrato e incubação a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  sob regime de luz alternada (12h luz branca fluorescente/ 12h escuro); b) os gêneros fúngicos mais freqüentemente presentes nas sementes de cana-de-açúcar foram *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Phoma*; c) não foi constatada relação entre incidência fúngica e ambiente de produção das sementes; d) a condição de semente de cana-de-açúcar mais comumente encontrada com presença de fungos associados foi a não germinada, independentemente do fungo avaliado. Houve baixa porcentagem de sintomas necróticos na parte aérea e raiz, no entanto, quando ocorreram, estavam associados às incidências dos fungos *Bipolaris sacchari*, *Curvularia* GM1, *Fusarium verticillioides* e *Phoma herbarum*; e) os gêneros considerados altamente patogênicos foram *Bipolaris* e *Curvularia*, considerando-se os demais medianos, pouco/ não patogênicos; f) os fungicidas de maiores eficiências de inibição, principalmente dos fungos patogênicos,

foram triadimenol e fludioxonil + metalaxil-M; g) o fungicida não fitotóxico e que apresentou efeito estimulante nas doses utilizadas foi o fludioxonil + metalaxil-M. Quando esse fungicida foi aplicado na validação, as doses avaliadas não foram suficientes para se detectar diferença significativa benéfica, de acordo com as variáveis analisadas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Fungos; Identificação; Patogenicidade; Controle

## ABSTRACT

### **Sugarcane seedborne (caryopses) fungi in Brazil: identification, pathogenicity and control.**

The present study had as objectives: to investigate the most adequate method to detect sugarcane seedborne fungi; to do the survey of the seedborne fungi and of the incidence; to correlate the fungi incidence in the seeds and the conditions where they were produced; to evaluate the possible effects that seedborne fungi have on seeds and seedlings; to verify the pathogenicity of the most frequent ones and the symptoms that they can cause; to determine the sensitivity of the main fungi to fungicides; to determine the seeds and seedlings phytotoxicity to fungicides and to propose the most adequate fungicidal treatment to the production of vigorous seedlings, without symptoms, to the breeding programs. To assess the most adequate method to detect seedborne fungi, health tests using different combinations between containers, substrates and light regimen, were done. To do the survey of seedborne fungi and their incidence on seeds, seed health tests of 29 samples and the fungal incidence obtained were compared with the climatic data from where the seeds were produced. The effects that seedborne fungi have on seeds and seedlings were studied by health and seed germination tests and the conditions of seeds and seedlings with fungi incidence were observed. The fungi pathogenicity, found in a higher frequency, was assessed by seed inoculation through contact with medium colonized by the fungi, than the seeds were distributed on sterilized substrate and the seedlings emergency and total seedlings with symptoms and kind of symptoms were assessed. By *in vitro* fungitoxicity assays, the sensitivity, of the most frequently detected fungi, to nine fungicides in the doses of 1, 10 and 100 ppm, was studied and ED<sub>50</sub>. The phytotoxicity *in vivo*, of the most efficient fungicide was done by spraying different doses on seeds distributed on sterilized substrate. Emergency, seedling height of aerial part and length of the root, total of seedlings with phytotoxicity symptoms and other kind of symptoms were assessed. A validation, *in vitro*, was done by spraying the efficient and non phytotoxic fungicide on sugarcane seeds. Obtained results were: a) the chosen method for health tests was the plastic Petri plates with filter paper as substrate and incubation at  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  under 12h alternating cycles of light and darkness; b) the fungi genera most frequently present on sugarcane seeds were: *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* and *Phoma*; c) the relation between fungal incidence and seed production conditions had not been noticed; d) the most commonly sugarcane seed condition found with seedborne fungi was the not-germinated, independently of the assessed fungi. Low percentage of necrotic symptoms on aerial part and root were observed, however, when occurred, it was associated to the incidence of the fungi *Bipolaris sacchari*, *Curvularia* GM1, *Fusarium verticillioides* and *Phoma herbarum*; e) the genera considered highly pathogenic were *Bipolaris* and *Curvularia*. The other fungi were considered of median pathogenicity or little/not pathogenic; f) the fungicides with a higher inhibition efficiency to most pathogenic fungi, were triadimenol and fludioxonil + metalaxil-M; g) fludioxonil + metalaxil-M was not a phytotoxic fungicide and presented stimulant effect on used doses. When this fungicide was applied on the

validation, the assessed doses were not enough to detect beneficial significant differences, in agreement with the analyzed variables.

Key-words: Sugarcane; Seedborne fungi; Identification; Pathogenicity; Control

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Métodos do papel de filtro (1) e meio agar-água com papel sulfite quadriculado (2) em placa de Petri. Ambos comparados quanto à sensibilidade, economicidade e praticidade em análise sanitária de sementes de cana-de-açúcar .....28
- Figura 2 - Organograma dos tratamentos nos quais foram utilizados diferentes materiais de placa de Petri, regimes de luz, e substratos .....29
- Figura 3 - Agrupamentos morfológicos dos gêneros *Curvularia*, *Bipolaris* e *Cladosporium* encontrados associados às sementes de cana-de-açúcar .....33
- Figura 4 - Fungos encontrados nas análises sanitárias: *Alternaria alternata* (1), *Aspergillus* sp. (2), *Bipolaris sacchari* (3), *Bipolaris* GM1 (4), *Cladosporium* GM1 (5), *Cladosporium* GM2 (6), *Colletotrichum* sp. (7), *Trichoderma* sp. (8), *Curvularia* GM1 (9), *Curvularia* GM3 (10), *Fusarium verticillioides* (11), *Fusarium semitectum* (12), *Leptosphaerulina* sp. (13), *Periconia* sp. (14), *Phoma herbarum* (15).....34
- Figura 5 - Umidades relativas e temperaturas médias (20 dias) em que as sementes dos 29 cruzamentos foram produzidas. Separação em 3 grupos climáticos distintos para posteriores observações do efeito do ambiente na incidência de cada um dos fungos associados às sementes de cana-de-açúcar .....43
- Figura 6 - Presença de sintomas associados a fungos encontrados na análise sanitária de sementes de cana-de-açúcar: conídios de *Bipolaris sacchari* em lesão de colo e necrose da raiz (1 e 2); conídios de *Fusarium verticillioides* em lesão fraca na folha (3); conídios e

micélio de *Fusarium semitectum* em necrose no colo e morte de plântula (4 e 5); conídios de *Curvularia* GM1 em necrose no colo e lesão fraca na parte aérea (6 e 7) .....55

- Figura 7 - Sintomas observados em plântulas emergidas em teste de sanidade e germinação de sementes: sintomas na parte aérea: fraco (1); médio (2); severo (3); no colo – rachadura (4); necrose (5); necrose na raiz (6); plântula morta (7 e 8); e plântula sadia (9 e 10).....65
- Figura 8 - Efeito de triadimenol, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....81
- Figura 9 - Efeito de captana, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....82
- Figura 10 - Efeito de carbendazim + tiram, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....83
- Figura 11 - Efeito de tolifluanida, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....84
- Figura 12 - Efeito de fludioxonil + metalaxil- M, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....85

- Figura 13 - Efeito de pencicuirom, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....86
- Figura 14 - Efeito de mancozeb + metalaxil- M, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....87
- Figura 15 - Efeito de iprodiona, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....88
- Figura 16 - Efeito de carboxina + tiram, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar .....89

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Identificação das sementes de 29 cruzamentos (policruzamentos e biparentais) de cana-de-açúcar, dos anos 2002, 2003 e 2004, utilizadas para análise sanitária por meio do método do papel de filtro, para o conhecimento da micoflora associada às sementes .....31
- Tabela 2 - Incidência (%) fúngica em sementes de cana-de-açúcar, do cruzamento SP81231 X SP963295, em oito diferentes métodos.....35
- Tabela 3 - Incidência (%) fúngica em sementes de cana-de-açúcar, do cruzamento SP953387 X RB815396, em oito diferentes métodos.....35
- Tabela 4 - Incidência (%) fúngica em sementes de cana-de-açúcar, do cruzamento SP992254 X SP953163, em oito diferentes métodos.....36
- Tabela 5 - Significância entre fatores (regime de luz, substrato e recipiente) que afetaram a incidência de fungos em sementes de cana-de-açúcar do cruzamento SP81231 X SP963295.....37
- Tabela 6 - Significância das interações metodológicas entre regime de luz, substrato e recipiente, na incidência fúngica em sanidade de sementes do cruzamento SP992254 X SP953163 .....37
- Tabela 7 - Significância das interações metodológicas entre regime de luz, substrato e recipiente, na incidência fúngica em sanidade de sementes do cruzamento SP953387 X RB815396 .....38
- Tabela 8 - Resultado das análises sanitárias de sementes provenientes de 29 cruzamentos do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do CTC dos anos de 2002, 2003 e 2004 .....42

Tabela 9 - Incidência de fungos em sementes de cana-de-açúcar provenientes de 29 cruzamentos produzidos em ambientes .....	44
Tabela 10 - Resultado das análises sanitárias e de germinação de sementes provenientes de 29 cruzamentos do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do CTC e verificação da associação de estruturas fúngicas dos fungos <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium semitectum</i> , <i>Bipolaris sacchari</i> , <i>Bipolaris</i> GM1, <i>Bipolaris</i> GM2 e <i>Phoma herbarum</i> aos sintomas causados em plântulas emergidas .....	53
Tabela 11 - Resultado das análises sanitárias e de germinação de sementes provenientes de 29 cruzamentos do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do CTC e verificação da associação de estruturas fúngicas os fungos <i>Cladosporium</i> GM1, <i>Cladosporium</i> GM2, <i>Curvularia</i> GM1, <i>Curvularia</i> GM2, <i>Curvularia</i> GM 3 e <i>Penicillium</i> sp. aos sintomas causados em plântulas emergidas .....	54
Tabela 12 - Isolados de cada espécie fúngica utilizados para avaliação de patogenicidade .....	62
Tabela 13 - Teste de patogenicidade de fungos isolados de semente de cana-de-açúcar por meio de inoculação de sementes por contato com a colônia fúngica .....	63
Tabela 14 - Fungicidas comparados quanto à eficiência <i>in vitro</i> para controle de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar.....	73
Tabela 15 - Isolados de fungos patogênicos associados às sementes de cana-de-açúcar submetidos a fungitoxicidade <i>in vitro</i> .....	73

Tabela 16 - Fungicidas utilizados para avaliação de fitotoxicidade <i>in vivo</i> no tratamento em sementeira de cana-de-açúcar para o controle de fungos associados.....	77
Tabela 17 - Concentração (ppm) de fungicida necessária para inibir em 50% (ED <sub>50</sub> ) o crescimento micelial de 17 isolados de fungos patogênicos à cana-de-açúcar .....	80
Tabela 18 - Efeito do tratamento químico de diferentes fungicidas e doses sobre a emergência de plântulas, altura da parte aérea, comprimento de raiz e tipos de sintomas de fitotoxicidade .....	92
Tabela 19 - Resultados da validação do experimento de controle químico de patógenos associados às sementes de cana-de-açúcar.....	94

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o estado de São Paulo, o maior produtor nacional. Segundo a FAO (2006), dentre a produção mundial, de 1.289.820 mil t em 19.704 mil ha, a produção dos canaviais brasileiros é de 420.121 mil t em uma área de 5.767 mil ha. Isso mostra que o rendimento brasileiro está acima da média mundial. No estado de São Paulo, a produção é de 244.284 mil t em uma área de 2.960 mil ha, rendimento maior do que a média nacional. Com os mais baixos custos de produção praticados na cana-de-açúcar, o Brasil se tornou o maior exportador mundial de açúcar e se prepara também para atender parte da grande demanda internacional de álcool para substituir os derivados de petróleo (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006). Grande parte deste sucesso e do alto rendimento dos canaviais brasileiros se deve aos programas de melhoramento genético que propiciaram a utilização de variedades mais adaptadas, produtivas e resistentes aos patógenos e outras adversidades. Esse constante aperfeiçoamento das técnicas empregadas no melhoramento e a seleção de novas variedades contribuem, em muito, para que esse sucesso continue.

No melhoramento genético convencional da cana-de-açúcar, o florescimento e a obtenção de "sementes" (cariopses) por hibridização (policruzamento ou biparental) dependem de condições especiais de temperatura e luminosidade. A produção de sementes, nessas condições, está sujeita à incidência de fungos fitopatogênicos, que podem limitar a sua formação, tornando-as inférteis, prejudicando sua germinação, ou causando morte das plântulas, ou seja, reduzindo o sucesso e rapidez em um programa de melhoramento genético.

As plântulas suscetíveis aos patógenos podem morrer em 3 a 4 dias após a germinação e aquelas resistentes, que conseguem crescer na presença dos patógenos por 2 a 3 semanas, podem se recuperar da infecção, segundo Byther e Steiner (1972). De acordo com Sanguino (1976), os fungos que se encontram nas sementes atuam indiscriminadamente tanto em plântulas, que no futuro formarão plantas suscetíveis, como também naquelas que formarão plantas resistentes. Esses dados indicam que plântula jovem de cana-de-açúcar parece não possuir resistência

definida. As plântulas, que poderiam gerar futuras variedades resistentes às principais doenças e com características comerciais desejáveis, podem morrer, pela ação de patógenos, antes mesmo de serem submetidas à seleção.

Embora alguns autores (SANGUINO, 1976; BYTHER; STEINER, 1972; LOVELESS; SMITH, 1956) tenham encontrado fungos associados às sementes e realizado testes de patogenicidade, ainda faltam dados sobre o método mais adequado de detecção dos fungos associados às sementes de cana-de-açúcar, sobre a patogenicidade destes e sobre o controle mais eficiente.

Diante desse quadro, o presente estudo teve como objetivos: investigar o método mais adequado para detecção e identificação de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar; fazer o levantamento dos fungos associados e da incidência em sementes; correlacionar a incidência fúngica nessas sementes e o ambiente onde foram produzidas; verificar a patogenicidade dos fungos mais freqüentes e os sintomas que podem causar; determinar a sensibilidade *in vitro* dos principais fungos a fungicidas; determinar a fitotoxicidade de sementes e plântulas a fungicidas; propor o tratamento fungicida mais adequado para produção de plântulas vigorosas, sem sintomas, para os programas de melhoramento.

## Referências

BYTHER, R.S.; STEINER, G.W. Four sugarcane seedling diseases in Hawaii: causal agents, control, and a selective medium for isolation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 120-124, 1972.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>>. Acesso em: 4 ago. 2006.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana. In \_\_\_\_\_. **Agrianual 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2004. p. 213-231.

LOVELESS, A.R.; SMITH, C.E.M. Seedling blight of sugar-cane: a new disease caused by *Helminthosporium sacchari* Butler. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 44, n. 4, p. 419-424, 1956.

SANGUINO, A. **Patologia e controle dos fungos de sementes de cana-de-açúcar e resistência de progênies à *Helminthosporium sacchari***. 1976. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

## 2 FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES (CARIOPSES) DE CANA-DE-AÇÚCAR: MÉTODOS PARA DETECÇÃO, INCIDÊNCIA E RELAÇÃO ENTRE INCIDÊNCIA FÚNGICA E AMBIENTE DE PRODUÇÃO DAS SEMENTES.

### Resumo

O presente trabalho teve como objetivos: determinar o método mais adequado para detecção e identificação de fungos associados às sementes (cariopses) de cana-de-açúcar; caracterizar os fungos associados e verificar as porcentagens de incidência e relacionar a incidência fúngica nessas sementes com o ambiente onde foram produzidas. Foram comparados métodos para analisar a sanidade de sementes de cana-de-açúcar, utilizando dois tipos de recipientes (placa de Petri de vidro e de plástico), de substratos (papel de filtro sobre meio de cultura agar-água e apenas papel de filtro) e de regimes de luz (12 h luz branca fluorescente/12 h escuro e escuro contínuo). As sementes foram mantidas durante sete dias sob temperatura constante de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , quando se procedeu à avaliação. Os requisitos para comparação dos métodos foram sensibilidade, economicidade e praticidade. A partir do método determinado como o mais adequado, foi realizada análise sanitária de 29 cruzamentos dos anos de 2002, 2003 e 2004, caracterizando os fungos associados e verificando as porcentagens de incidência. Posteriormente, comparou-se estas porcentagens com as condições ambientes, de temperatura e umidade relativa, em que as sementes foram produzidas no programa de melhoramento genético. O método considerado mais adequado, de acordo com os parâmetros analisados, foi o do papel de filtro em placa de Petri de plástico e incubação sob regime de luz (12 h luz branca fluorescente/12 h escuro). Os fungos detectados foram: *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *Bipolaris sacchari*, três grupos morfológicos distintos pertencentes ao gênero *Bipolaris*, dois grupos morfológicos de *Cladosporium*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* spp., *Epicoccum* sp., *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum*, *Leptosphaerulina* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Phoma herbarum*, *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. Os mais freqüentemente encontrados foram: *Bipolaris sacchari*, *Bipolaris* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum* e *Phoma herbarum*. Quando se comparou a incidência dos diversos fungos com o ambiente de produção das sementes, observou-se que não houve relação de temperatura e umidade relativa com incidência fúngica. Supõe-se que as variações possam estar relacionadas com diferentes fontes de inóculo nos locais de cruzamento das plantas ou características genéticas das sementes.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Semente; Método; Detecção; Incidência fúngica

## **SUGARCANE SEEDBORNE (CARYOPSES) FUNGI: DETECTION METHODS, INCIDENCE AND RELATION BETWEEN FUNGICAL INCIDENCE AND SEED PRODUCTION CONDITIONS.**

### **Abstract**

The present work had as objectives: to determine the most adequate method for detection and identification of sugarcane seedborne fungi; to characterize the associated fungi, to verify the incidence and to relate the fungical incidence in these seeds with the conditions where they were produced. Methods to analyze the sugarcane seeds health were compared, using two types of containers (glass and plastic Petri plate), substrate (filter paper on agar-water culture medium and only filter paper) and light regimen (12h alternating cycles of light and darkness and continuous darkness). The seeds were kept during seven days under constant temperature of  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , when the evaluations were preceded. The requirements for methods comparison were sensitivity, economicity and practicality. After determined the most adequate method, health tests of 29 crosses of the years 2002, 2003 and 2004 was done, characterizing the seedborne fungi and verifying the incidence percentages. Later, these percentages were compared to the conditions of temperature and relative humidity from where the seeds were produced at the breeding program. The method considered most appropriated, in agreement with the analyzed parameters, was the filter paper in plastic Petri plate and the incubation under light regimen (12h alternating cycles of light and darkness). The detected fungi were: *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *Bipolaris sacchari*, three distinct morphologic groups of the *Bipolaris* genera, two morphologic groups of *Cladosporium*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* spp., *Epicoccum* sp., *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum*, *Leptosphaerulina* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Phoma herbarum*, *Rhizopus* sp. and *Trichoderma* sp. The most frequently found were: *Bipolaris sacchari*, *Bipolaris* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum* and *Phoma herbarum*. When the incidence percentage of the diverse fungi was compared with the seed production conditions, the relation of temperature and relative humidity with fungical incidence was not noticed. It was considered that the variations can be related to different sources of inoculum where the plants were crossed or to genetic characteristics of the seeds.

Key-words: Sugarcane; Seedborne fungi; Method; Detection; Fungical incidence

## 2.1 Introdução

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância no mundo, sendo utilizada, principalmente, para obtenção de açúcar e de álcool etílico. Além desses produtos, a cana-de-açúcar também tem importantes subprodutos (bagaço, levedo, vinhaça e torta de filtro), utilizados na geração de energia, na produção de ração animal, nos produtos aglomerados e nos fertilizantes, entre outros (FIGUEIREDO et al., 1998).

O Brasil vem se destacando como o maior produtor de cana-de-açúcar, sendo responsável por, aproximadamente, 33% da produção mundial, seguido por Índia (18%), China (6,9%), Tailândia (3,6%), Paquistão (3,7%) e México (3,5%) (FAO, 2006). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional (58,1%), seguido por Paraná (7,8%), Alagoas (6,1%) e Minas Gerais (6%) (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006).

Segundo dados da FNP Consultoria & Comércio (2004), há tendência, no futuro, de uma crescente demanda de álcool e açúcar. A redução das reservas mundiais de petróleo e o provável aumento do seu custo podem definir a preferência internacional pelo álcool como combustível. Quanto ao açúcar, o forte crescimento econômico da Ásia deve aumentar a renda de quase metade da população do mundo; em consequência, haverá maior demanda de açúcar, gerando um crescente aumento de sua produção.

Um dos caminhos para aumentar o rendimento da cana-de-açúcar são os estudos que propõem métodos de melhoramento genético da cultura. Na cana-de-açúcar, muitos plantios já sofreram verdadeiros colapsos por doenças epidêmicas, levando agricultores a recorrerem à substituição da variedade suscetível por outra resistente ou imune ou, pelo menos, tolerante (HEINZ, 1987).

Resistência às doenças tem sido uma das maiores preocupações, na seleção de clones, para o crescimento de programas de melhoramento genético (HEINZ, 1987). Nos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, as sementes equivalem ao produto do cruzamento de duas variedades que tenham qualidades desejáveis.

Uma limitação do cruzamento de duas variedades é a recombinação. Grande parte das sementes não tem as qualidades requeridas e, por isso, têm de ser

produzidas em grandes quantidades. Poucas são encontradas herdando as características desejadas dos “parentais” (EDGERTON, 1955).

Muitas vezes a má germinação ou emergência apresentada pelas sementes de um determinado cruzamento é atribuído à infertilidade, à má formação das sementes ou aos patógenos do solo, sem levar em conta a grande quantidade de patógenos que são trazidos pelas próprias sementes (SANGUINO, 1976). Há patógenos que causam a morte dessas sementes ou plântulas, resultando na falta de materiais para futura obtenção de uma boa variedade.

As plântulas suscetíveis aos patógenos morrem depois de três ou quatro dias da germinação, segundo Byther e Steiner (1972). As plântulas resistentes, que conseguem crescer na presença dos patógenos em duas ou três semanas, podem se recuperar da infecção. Entretanto, segundo Sanguino (1976), os fungos associados às sementes atuam indiscriminadamente, tanto em plântulas que formam plantas suscetíveis como naquelas que formam plantas resistentes. Quando plântula, a cana-de-açúcar parece não possuir resistência definida. Plântulas que poderiam gerar futuras variedades, resistentes aos principais patógenos e com características comerciais desejáveis, podem morrer antes mesmo de serem avaliadas.

Os principais agentes causais das doenças que limitam a produção das sementes são os fungos que, quando associados a essas, são beneficiados pela maneira e pelas condições ambientes (altas umidade e temperatura) em que as sementes são produzidas (SANGUINO, 1976). Estes patógenos causam prejuízos significativos em viveiros de plântulas, limitando o sucesso e a rapidez dos programas de melhoramento genético.

As atividades prejudiciais de fungos associados às sementes, no início de desenvolvimento da cana-de-açúcar, têm papel muito importante, de acordo com Sanguino<sup>1</sup>, pois, podem resultar no fracasso da obtenção de plantas de cruzamentos importantes, principalmente em países que têm produção de poucos quilos de sementes (informação verbal), sendo então necessários estudos detalhados e sistemáticos sobre esse assunto.

---

<sup>1</sup> SANGUINO, A. Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

Para o controle eficiente dos patógenos prejudiciais às “sementes” verdadeiras, é necessária a realização de sua análise sanitária, com o propósito da identificação dos fungos associados, definindo, assim, o foco do tratamento químico. A partir do resultado desse teste, é possível encontrar o fungicida apropriado para o controle desses fungos.

Alguns trabalhos tratam de análise sanitária de sementes de cana-de-açúcar (LOVELESS; SMITH, 1956; SANGUINO, 1976; SILVA, 1978; SINHA; SINGH, 1982); entretanto, há divergência sobre qual o melhor método para análise.

O levantamento dos gêneros de fungos que podem estar associados às sementes de cana-de-açúcar foi realizado por Sanguino (1976). Este utilizou o método do agar-água, sob papel sulfite quadriculado, em placas de Petri e encontrou os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Monilia*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Phoma*, *Pithomyces*, *Rhizopus* e *Trichoderma*.

Para a determinação dos fungos presentes nas sementes de cana-de-açúcar, Silva (1978) utilizou o método de distribuição de sementes em meio agar-água em placas de Petri. Seus resultados foram similares aos de Sanguino (1976). Em estudo semelhante, Narendra e Setty (1979) empregaram os métodos agar-água e papel de filtro em placas de Petri e constataram que o segundo método resultou em melhores resultados do que o primeiro. Os gêneros associados às sementes, encontrados por estes autores, foram: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Diplodia*, *Bipolaris*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Lacellinopsis*, *Malustela*, *Memnoniella*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phyllosticta*, *Pyrenochaeta*, *Scopulariopsis* e *Trichoconis*. Em muitos desses gêneros encontrados foram identificadas diversas espécies.

A comparação entre dois métodos de detecção de fungos em sementes de cana-de-açúcar (batata-dextrose-ágar e papel de filtro em placas de Petri) foi feita por Sinha e Singh (1982). Esses pesquisadores encontraram as seguintes espécies: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *C. verruculosa*, *Bipolaris hawaiiensis*, *B. rostrata*, *B. sacchari*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *Phoma sorghina*, *Penicillium* sp. e *Rhizopus arrhizus*. No entanto, apenas as espécies de *Curvularia*, *Bipolaris*, *Aspergillus* e *Chaetomium* foram encontradas com grande frequência. Os resultados obtidos na

comparação dos métodos mostraram que o do papel de filtro foi o mais sensível e apresentou maior frequência dos fungos, quando comparado ao método de batata-dextrose-ágar.

Dentre as determinações dos fungos associados apresentadas pelos autores que estudaram a incidência de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar, observa-se que existem gêneros que só foram relatados em determinados países. Um desses casos é o da Índia, país de origem da cana-de-açúcar, onde foram relatados os gêneros: *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Diplodia*, *Lacellinopsis*, *Malustela*, *Memnoniella*, *Phylosticta*, *Pyrenochaeta*, *Scopulariopsis* e *Trichoconis* (NARENDRA; SETTY, 1979). Outro caso, no Brasil, Sanguino (1976) constatou pela primeira vez gêneros como *Monilia*, *Pestalotia*, *Pithomyces* e *Trichoderma*. Outros, como *Curvularia* e *Bipolaris* têm ocorrência generalizada e *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phoma*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Epicoccum* já foram relatados na Índia e no Brasil.

De acordo com Lucca Filho (1987) e Rego (2005), os métodos do papel de filtro e o plaqueamento em agar são os mais efetivos na detecção de fungos transportados por sementes, pois são capazes de revelar a presença de hifas, corpos de frutificação e esporos, independentemente da sua localização, externa ou interna nas sementes.

Além de sensibilidade na detecção, Mathur e Kongdal (2003) analisam os parâmetros de praticidade e economicidade. Segundo esses autores, o método do papel de filtro é simples e barato, além de ser útil na detecção de patógenos e outros microrganismos associados às sementes. O princípio desse teste é promover condições ótimas de alta umidade relativa, luz e temperatura para o desenvolvimento do fungo.

Considerando essa diversidade de opiniões sobre o método mais adequado para a análise sanitária da semente de cana-de-açúcar, o presente estudo teve como objetivo investigar o método mais adequado para detecção de fungos associados às sementes (cariopses) de cana-de-açúcar, caracterizar os fungos associados e verificar as porcentagens de incidência e relacionar incidência fúngica nessas sementes e ambiente onde foram produzidas.

## 2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ – USP e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) em Piracicaba-SP.

As sementes utilizadas eram provenientes de plantas híbridas, produzidas nos programas de melhoramento realizados em 2002, 2003 e 2004, na Estação Experimental do CTC, com sede em Camamú (BA), e semibeneficiadas, retirando os pêlos e talos, restando apenas a cariopse envolta pelas pálea e lema.

### 2.2.1 Verificação do método mais adequado para detecção e identificação de fungos associados às sementes (cariopses) de cana-de-açúcar

Foram comparados dois substratos, em placas de Petri, anteriormente contatados na literatura como os mais eficientes na detecção de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar: agar-água com papel quadriculado (SANGUINO, 1976) e papel de filtro (NARENDRA; SETTY, 1979) (Figura 1).

Utilizaram-se placas de Petri de plástico e de vidro do tipo pírex, visando verificar se o material do recipiente pode influenciar de alguma forma a incidência dos fungos. Também se verificou a influência da incubação sob diferentes regimes de luz (12h luz branca fluorescente/ 12h escuro e escuro contínuo) na incidência fúngica.

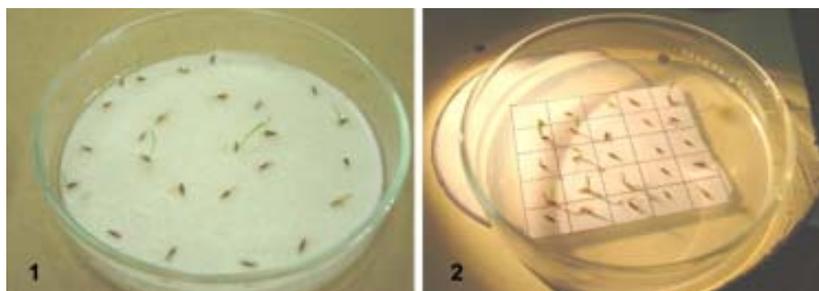


Figura 1 - Métodos do papel de filtro (1) e meio agar-água com papel sulfite quadriculado (2) em placa de Petri. Ambos comparados quanto à sensibilidade, economicidade e praticidade em análise sanitária de sementes de cana-de-açúcar

Para comparação entre os métodos, esse teste foi realizado com sementes de três cruzamentos: SP81231 X SP963295; SP953387 X RB815396 e SP992254 X SP953163, todos provenientes do programa de cruzamento de 2004.

No método do agar-água (SANGUINO, 1976) foram distribuídas 25 sementes por placa de Petri de vidro e de plástico, com papel sulfite quadriculado (75g/m<sup>2</sup>) sobre meio agar-água (para fornecer umidade), colocando-se uma semente por quadrícula do papel.

O método do papel de filtro (NARENDRA; SETTY, 1979; NEERGAARD, 1979; LUCCA FILHO, 1987), consistiu em distribuir 25 sementes eqüidistantes (a fim de manter distância adequada e evitar o contato entre sementes portadoras de patógenos e sadias) em três folhas de papel de filtro umedecidos com água destilada, em placas de Petri de plástico e de vidro.

Nos diferentes métodos, as placas foram mantidas sob regimes de luz alternada (12h luz branca fluorescente/ 12h escuro) e escuro contínuo, por sete dias, sob temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A ilustração dos tratamentos se encontra na Figura 2.

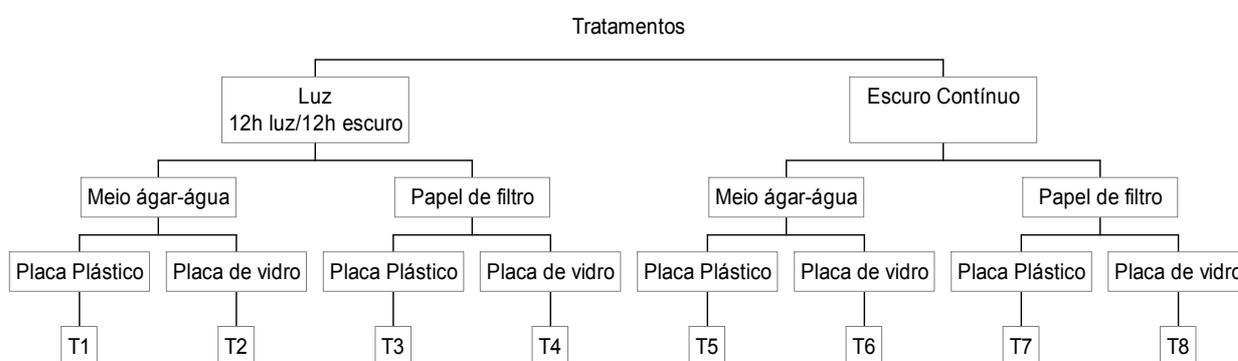


Figura 2- Organograma dos tratamentos nos quais foram utilizados diferentes materiais de placa de Petri, regimes de luz, e substratos

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, em um esquema fatorial 2x2x2 e cada tratamento constou de quatro repetições de 50 sementes cada.

As avaliações foram realizadas examinando-se todas as sementes sob estereomicroscópio e, se necessário, microscópio composto, e foram detectados e

identificados os fungos associados às sementes em função das condições de luz e escuro, do tipo de placa utilizada (vidro e plástico) e do substrato empregado (agar-água e papel de filtro). Os critérios para a comparação destes métodos foram: sensibilidade, economicidade e praticidade.

Os dados obtidos foram transformados em arco sen  $\sqrt{x / 100}$  e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### **2.2.2 Levantamento dos fungos associados e da incidência em sementes de cana-de-açúcar provenientes dos programas de melhoramento dos anos de 2002, 2003 e 2004 e relação entre a incidência fúngica e o ambiente onde foram produzidas**

Nesta etapa, utilizaram-se sementes de 29 cruzamentos, tanto biparentais quanto policruzamentos, realizados em diferentes anos (2002, 2003 e 2004) e dentre cada um desses anos, realizados em diferentes semanas, isto é, que formaram sementes em condições ambiente diferentes (Tabela 1). Foram observados dados climáticos coletados pelo CTC da região de produção das sementes desses cruzamentos para a verificação da relação entre a incidência fúngica nas sementes e o ambiente onde foram produzidas, considerando que a incidência fúngica pode ser afetada pela variação das temperatura (T) e umidade relativa (UR) prevalente. Plotaram-se, em um gráfico, os dados das condições (temperatura e umidade relativa) em que cada cruzamento foi produzido. A temperatura e a umidade relativa foi calculada por meio de média das máximas e mínimas que ocorreram durante 20 dias (período desde o dia do cruzamento, até coleta das sementes). Os cruzamentos formados em diferentes condições climáticas foram divididos em grupos e, posteriormente, foi analisado o efeito do ambiente na incidência de cada fungo nas sementes de cana-de-açúcar.

Tabela 1 - Identificação das sementes de 29 cruzamentos (policruzamentos e biparentais) de cana-de-açúcar, dos anos 2002, 2003 e 2004, utilizadas para análise sanitária por meio do método do papel de filtro, para o conhecimento da micoflora associada às sementes

Nº cruzamento	Cruzamento	Dia do cruzamento	Nº cruzamento	Cruzamento	Dia do cruzamento
1	CTC9821 X CTC9638	07/05/2002	16	SP993974 X SP921788	07/05/2004
2	CTC00609	14/05/2002	17	SP971275 X CTC9638	07/05/2004
3	SP913059 X SP963247	14/05/2002	18	SP993964 X SP921788	07/05/2004
4	CTC00528	17/05/2002	19	SP962059 X SP953163	07/05/2004
5	SP841727 X SP903588	24/05/2002	20	SP004330	18/05/2004
6	SP913059 X SP835073	28/05/2002	21	SP004314	21/05/2004
7	SP941117	31/05/2002	22	SP002392	21/05/2004
8	SP953390 X SP931231	06/05/2003	23	CTC00805	21/05/2004
9	SP961216 X IAC912195	13/05/2003	24	SP012431	21/05/2004
10	SP951114 X SP891117	20/05/2003	25	IASP973400	01/06/2004
11	SP953387 X RB815396	20/05/2003	26	SP004319	01/06/2004
12	CTC00765 X SP921852	16/05/2003	27	SP973671	04/06/2004
13	SP963472 X SP88721	30/05/2003	28	IASP973314	04/06/2004
14	CTC00701 X SP931216	27/05/2003	29	IASP972056	04/06/2004
15	SP992254 X SP953163	07/05/2004			

Para levantamento dos fungos associados (gêneros/ espécies de fungos detectados) e da incidência, realizou-se análise sanitária de sementes dos 29 cruzamentos.

Na análise sanitária foi empregado o método de placas de Petri de plástico contendo como substrato papel de filtro umedecido com água destilada. A incubação das sementes foi feita sob regime de luz alternada (12h luz branca fluorescente/ 12h escuro), por sete dias a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  (temperatura ideal utilizada nos programas de melhoramento para germinação das sementes de cana-de-açúcar). Após esse período, foram realizadas avaliações, examinando-se todas as sementes, através de estereomicroscópio e, se necessário, microscópio composto, que permitiram a detecção e identificação dos fungos associados às sementes de cana-de-açúcar.

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado e cada tratamento constou de cinco repetições de 50 sementes cada.

Os dados obtidos foram transformados em arco sen  $\sqrt{x / 100}$  e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### **2.2.3 Isolamento dos fungos freqüentemente associados às sementes de cana-de-açúcar**

Os fungos encontrados foram isolados e identificados com uma denominação especial. Atribuíram-se siglas referentes: ao gênero do fungo, à espécie ou ao grupo morfológico, ao hospedeiro e ao número do isolamento. Por exemplo, um fungo isolado denominado CV01SC02 corresponde ao gênero *Curvularia* (CV), do grupo morfológico 01, à planta hospedeira cana-de-açúcar (SC) e ao segundo isolamento do grupo morfológico 01 desse gênero.

Foi feito o isolamento monospórico de todos os fungos mais freqüentes. Para os fungos de conídios maiores ou no caso de picnídios (*Curvularia* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium semitectum* e *Phoma herbarum*), foi transferido, sob microscópio ótico, apenas uma estrutura para placas de Petri contendo meio BDA, utilizando uma agulha de acupuntura esterilizada. Para os de conídios menores (*Fusarium verticillioides* e *Cladosporium* spp.), foi feita uma suspensão de esporos em água destilada autoclavada e 250 µL dessa suspensão foram espalhadas, com alça de Drigalsky, em meio BDA. Em seguida, por meio de microscópio composto, foram marcadas, com caneta, na parte externa da placa, as regiões do meio BDA onde se encontravam os esporos isolados, assegurando a formação de culturas monospóricas puras. As placas foram mantidas sob condições controladas (temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e regimes de luz alternada 12h luz branca fluorescente/ 12h escuro). Depois de iniciado o crescimento do fungo, foram transferidos fragmentos do meio com cultura de uma das colônias puras para tubos de ensaio contendo meio BDA, sob fluxo laminar, para sua preservação, conforme Figueiredo (2001). Após a colonização do meio de cultura pelo fungo, uma camada de aproximadamente 1 cm de óleo mineral autoclavado foi colocada, cobrindo a superfície do meio, prevenindo-se, então, a desidratação do meio de cultura e reduzindo a atividade metabólica dos organismos preservados. Esses isolados se encontram no setor de Fitopatologia do CTC.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Verificação do método mais adequado para detecção de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar

Foram encontradas mais de uma espécie de alguns gêneros fúngicos. A diferenciação de espécies foi realizada por características morfológicas (BOOTH, 1971; CHIDAMBARAM; MATHUR; NEERGAARD, 1973; SIVANESAN, 1987; HANLIN, 1990; SINGH et al., 1991; BARNETT; HUNTER, 1998; MATHUR; KONGSDAL, 2003). Os recursos disponíveis, entretanto, não permitiram a identificação de algumas dessas. Por isso, as possíveis espécies dos gêneros *Curvularia*, *Bipolaris* e *Cladosporium*, não identificadas, foram agregadas em três grupos morfológicamente distintos e nomeadas, atribuindo-se números, como, por exemplo, *Curvularia* Grupo Morfológico do tipo 1 (*Curvularia* GM1). O esquema dos grupos morfológicos estão na Figura 3.

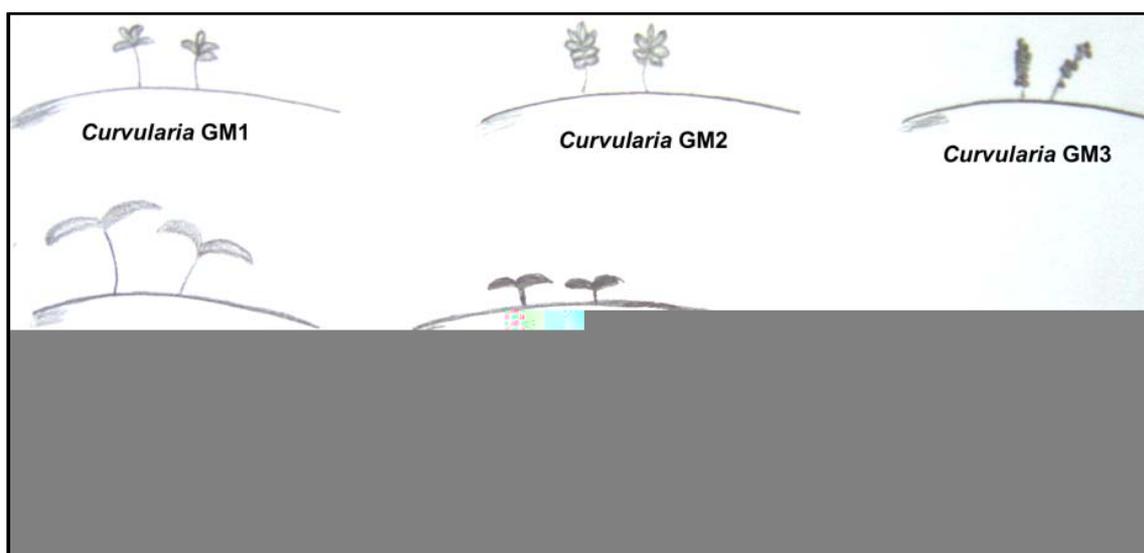


Figura 3 - Agrupamentos morfológicos dos gêneros *Curvularia*, *Bipolaris* e *Cladosporium* encontrados associados às sementes de cana-de-açúcar

Os fungos detectados foram: *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *Bipolaris sacchari*, *Bipolaris* GM1, *Bipolaris* GM2, *Cladosporium* GM1, *Cladosporium* GM2, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* GM1, *Curvularia* GM2, *Curvularia* GM3, *Epicoccum* sp., *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum*, *Leptosphaerulina* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Phoma herbarum*, *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. As fotos desses fungos foram apresentadas na Figura 4. Dentre esses fungos encontrados,

apenas os *Curvularia* GM1, *Bipolaris sacchari*, *Cladosporium* GM1, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum* e *Nigrospora* sp. tiveram incidência estatisticamente relevante, para permitir comparação entre tratamentos. Essas incidências estão nas tabelas 2, 3 e 4.



Figura 4 - Fungos encontrados nas análises sanitárias: *Alternaria alternata* (1), *Aspergillus* sp. (2), *Bipolaris sacchari* (3), *Bipolaris* GM1 (4), *Cladosporium* GM1 (5), *Cladosporium* GM2 (6), *Colletotrichum* sp. (7), *Trichoderma* sp. (8), *Curvularia* GM1 (9), *Curvularia* GM3 (10), *Fusarium verticillioides* (11), *Fusarium semitectum* (12), *Leptosphaerulina* sp. (13), *Periconia* sp. (14), *Phoma herbarum* (15)

Por meio dos dados apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, foram realizadas análises de variância para verificação de possíveis interações entre os fatores analisados (regime de luz, substrato e recipiente). Esta análise de variância está nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 2 - Incidência (%) fúngica em sementes de cana-de-açúcar, do cruzamento SP81231 X SP963295, em oito diferentes métodos

		Incidência fúngica (%)			
Tratamentos		<i>Cladosporium</i> GM1	<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Curvularia</i> GM1	<i>Nigrospora</i> sp.
T1	LAP*	46	14	12	5
T2	LAV	37	16	10	7
T3	LFP	43	17	13	7
T4	LFV	32	21	5	10
T5	EAP	36	12	8	2
T6	EAV	38	10	9	4
T7	EFP	33	14	10	1
T8	EFV	33	10	8	3
CV (%)		4	14	12	26

\*L= regime de luz alternada; E= escuro contínuo; A= agar-água; F= papel de filtro; P= placa de plástico; V= placa de vidro.

Tabela 3 - Incidência (%) fúngica em sementes de cana-de-açúcar, do cruzamento SP953387 X RB815396, em oito diferentes métodos

		Incidência fúngica (%)				
Tratamentos		<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Curvularia</i> GM1	<i>Aspergillus</i> sp.
T1	LAP*	13	6	19	16	28
T2	LAV	12	1	19	12	29
T3	LFP	15	4	17	15	34
T4	LFV	12	1	23	15	33
T5	EAP	17	4	18	10	11
T6	EAV	14	0	12	11	35
T7	EFP	13	6	20	12	19
T8	EFV	18	1	8	7	28
CV (%)		17	72	20	23	10

\*L= regime de luz alternada; E= escuro contínuo; A= agar-água; F= papel de filtro; P= placa de plástico; V= placa de vidro.

Tabela 4 - Incidência (%) fúngica em sementes de cana-de-açúcar, do cruzamento SP992254 X SP953163, em oito diferentes métodos

Tratamentos	Incidência fúngica (%)		
	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Curvularia</i> GM1
T1	LAP*	3	20
T2	LAV	2	21
T3	LFP	4	22
T4	LFV	4	24
T5	EAP	3	8
T6	EAV	10	13
T7	EFP	3	15
T8	EFV	5	20
CV (%)		55	47
			25

\*L= regime de luz alternada; E= escuro contínuo; A= agar-água; F= papel de filtro; P= placa de plástico; V= placa de vidro.

Pelos resultados da análise de variância (Tabelas 5, 6 e 7) verificou-se que para *Cladosporium* GM1, o regime de luz e o substrato interagem positivamente, quando o substrato é o papel de filtro e a incubação é em luz alternada.

Essa mesma análise indicou que, para o crescimento de *Bipolaris sacchari*, o regime de luz teve influência em todos os cruzamentos avaliados, desenvolvendo-se melhor em condições de luz alternada. No cruzamento SP953387 x RB815396 houve, também, significância na interação entre regime de luz e substrato, com maior incidência nas sementes submetidas à combinação papel de filtro e luz alternada.

Com relação à *Curvularia* GM1, o resultado das interações variou de acordo com o cruzamento. No cruzamento SP81231 X SP963295 houve interação entre regime de luz e substrato e entre recipiente e substrato. A melhor combinação foi papel de filtro, luz alternada e placa de plástico. Quanto ao cruzamento SP992254 X SP953163, apenas a interação entre regime de luz e recipiente foi significativa. *Curvularia* GM1 apresentou maiores incidências nas sementes submetidas às situações placa de Petri de vidro e luz alternada, ou placa de Petri de plástico e escuro contínuo. No cruzamento SP953387 X RB815396, houve diferença significativa apenas entre regimes de luz, observando-se as maiores incidências em luz alternada.

Tabela 5 - Significância entre fatores (regime de luz, substrato e recipiente) que afetaram a incidência de fungos em sementes de cana-de-açúcar do cruzamento SP81231 X SP963295

Fungos associados às sementes				
Fatores	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Curvularia</i> GM1	<i>Nigrospora</i> sp.
Regime de luz	*	*	n.s.	*
Recipiente	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Substrato	*	n.s.	*	*
Regime de luz x Recipiente	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Regime de luz x Substrato	*	n.s.	*	n.s.
Recipiente x Substrato	n.s.	n.s.	*	*
Regime de luz x Recipiente x Substrato	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV (%)	8	27	24	39

\* significativos ao nível de 5% de probabilidade.

n.s. = não significativo.

Tabela 6 - Significância das interações metodológicas entre regime de luz, substrato e recipiente, na incidência fúngica em sanidade de sementes do cruzamento SP992254 X SP953163

Fungos associados às sementes			
Fatores	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Curvularia</i> sp. 1
Regime de luz	*	*	n.s.
Recipiente	n.s.	n.s.	n.s.
Substrato	*	n.s.	n.s.
Regime de luz x Recipiente	*	n.s.	*
Regime de luz x Substrato	*	n.s.	n.s.
Recipiente x Substrato	n.s.	n.s.	n.s.
Regime de luz x Recipiente x Substrato	n.s.	n.s.	n.s.
CV (%)	27	25	13

\* significativos ao nível de 5% de probabilidade.

n.s. = não significativo.

Tabela 7 - Significância das interações metodológicas entre regime de luz, substrato e recipiente, na incidência fúngica em sanidade de sementes do cruzamento SP953387 X RB815396

Fatores	Fungos associados às sementes				
	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Curvularia GM1</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Regime de luz	n.s.	n.s.	*	*	*
Recipiente	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Substrato	n.s.	*	n.s.	n.s.	*
Regime de luz x Recipiente	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Regime de luz x Substrato	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
Recipiente x Substrato	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
Regime de luz x Recipiente x Substrato	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV (%)	18	73	21	24	11

\* significativos ao nível de 5% de probabilidade.  
n.s. = não significativo.

Entre as variáveis estudadas, no cruzamento SP953387 X RB815396, não houve interação significativa para *Fusarium verticillioides*. No cruzamento SP992254 X SP953163, houve interação entre regime de luz e recipiente (sendo melhor escuro e placa de Petri de vidro) e interação regime de luz e substrato (sendo melhores: escuro e agar-água, luz alternada e papel de filtro). Esses dados indicam, para *Fusarium verticillioides*, que a interação entre escuro, agar e vidro é a que propicia maior recuperação do fungo.

*Fusarium semitectum* não apresentou diferenças de incidência para as diferentes variáveis comparadas, com exceção do substrato papel de filtro, que permitiu aumento significativo na incidência desse fungo.

Os dados mostraram também diferenças significativas de incidência de *Nigrospora sp.* na interação regime de luz e substrato. As maiores incidências ocorreram na interação luz alternada e agar-água.

Para *Aspergillus sp.* houve interação significativa entre regime de luz e substrato e entre substrato e recipiente, sendo luz e papel de filtro, e papel de filtro e placa de plástico, respectivamente, as melhores interações.

Dentre os métodos comparados, verificou-se que para *Bipolaris sacchari*, *Curvularia* GM1, *Aspergillus* sp., o melhor foi regime de luz alternada, papel de filtro e placa de Petri de plástico. A maioria dos fungos requer regime de luz alternada para sua esporulação e papel de filtro para manter a umidade necessária para seu crescimento. Para o gênero *Fusarium* que, de acordo com literatura (BOOTH, 1971), deveria se desenvolver em regime de luz alternada, foi observado o contrário. *Fusarium semitectum* desenvolveu-se igualmente tanto na presença quanto na ausência de luz, porém o melhor substrato foi o papel de filtro. Já *Fusarium verticillioides* desenvolveu melhor na ausência de luz, no substrato agar-água em placas de Petri de vidro. Brasil (1992), Mathur e Kongsdal (2003) e Lucca Filho (1987) relataram que, tanto placas de Petri de vidro pírrex como as de plástico transparente, permitem a mesma passagem de luz, assim, a diferença de material utilizado não influenciaria a incidência dos fungos. É importante salientar que para *Fusarium verticillioides* o emprego da placa de Petri de plástico proporcionou menor incidência do que o da placa de vidro. Possivelmente algum outro fator, que não necessariamente a passagem da luz, influenciou neste resultado.

A literatura mostra que os fungos mais patogênicos e, por isso, mais importantes, são pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Curvularia* e *Bipolaris* (LOVELESS; SMITH, 1956; BYTHER; STEINER, 1971; SANGUINO, 1976; SINHA; SINGH, 1982).

Considerando-se apenas o critério sensibilidade, concluiu-se que o melhor método, que mais se adequou para a maioria dos fungos, patogênicos e secundários, foi o de regime de luz alternada, papel de filtro e placa de Petri de plástico.

De acordo com o critério praticidade, é importante salientar que todos aqueles tratamentos que exigem manufatura de meio de cultura requerem muito tempo de preparo para autoclavar e verter o meio. O uso de papel de filtro, como substrato, resultou em procedimento mais simples e rápido.

Além desses critérios, o método do papel de filtro é mais econômico, não necessitando de gastos com agar, energia com autoclave e vidrarias no preparo. Pode ser realizado em quaisquer condições de laboratório, inclusive os menos equipados.

Perante os dados apresentados, escolheu-se o método de placa de Petri de plástico, substrato papel de filtro e incubação sob regime de luz alternada (12h luz

branca fluorescente/ 12h escuro) para manufatura dos levantamentos dos fungos associados e da incidência em sementes de cana-de-açúcar, realizados posteriormente.

### **2.3.2 Levantamento dos fungos associados e da incidência em sementes de cana-de-açúcar provenientes dos programas de melhoramento nos anos de 2002, 2003 e 2004 e relação entre a incidência fúngica e o ambiente onde foram produzidas**

Os resultados do teste de sanidade de sementes estão presentes na Tabela 8.

Os fungos encontrados nas sementes, no decorrer destes testes, foram os mesmos encontrados na fase anterior, de comparação entre métodos. Os gêneros mais freqüentes, nos 29 cruzamentos avaliados nesta fase, foram: *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Phoma*. As espécies ou grupos morfológicos com freqüência média superior a 5% foram *Fusarium verticillioides*, *Bipolaris sacchari*, *Curvularia* GM1, *Phoma herbarum* e *Cladosporium* GM1.

Observou-se que há semelhança entre os gêneros fúngicos associados às sementes de cana-de-açúcar encontrados neste estudo e aqueles relatados em pesquisas anteriores, como as relatadas por Sanguino (1976), Byther e Steiner (1971), Loveless e Smith (1956) e Sinha e Singh (1982), como os gêneros: *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phoma*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Epicoccum* e *Nigrospora*. Há semelhança também quanto algumas espécies *Bipolaris sacchari*, *Fusarium semitectum*, já encontradas em trabalhos realizados anteriormente e neste.

No presente estudo não foram encontrados os gêneros *Pestalotia*, *Monilia*, *Pithomyces*, anteriormente relatados no Brasil por Sanguino (1976) e outros como *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Diplodia* e *Lacelinopsis*, relatados apenas na Índia por Narendra e Setty (1979).

Com relação a fungos nunca antes relatados em associação com sementes de cana-de-açúcar, no presente estudo, encontraram-se os gêneros *Colletotrichum*, *Leptosphaerulina* e *Periconia*, entretanto, em baixas incidências, não sendo considerados de grande importância atual. Há que ser comentado que existe flexibilidade quanto à importância de fungos, pois um organismo, em um determinado

momento, sem grandes importâncias, poderá ser um agente causal de doenças devastadoras no futuro. Por isso, estudos com esses novos patógenos devem ser desenvolvidos.

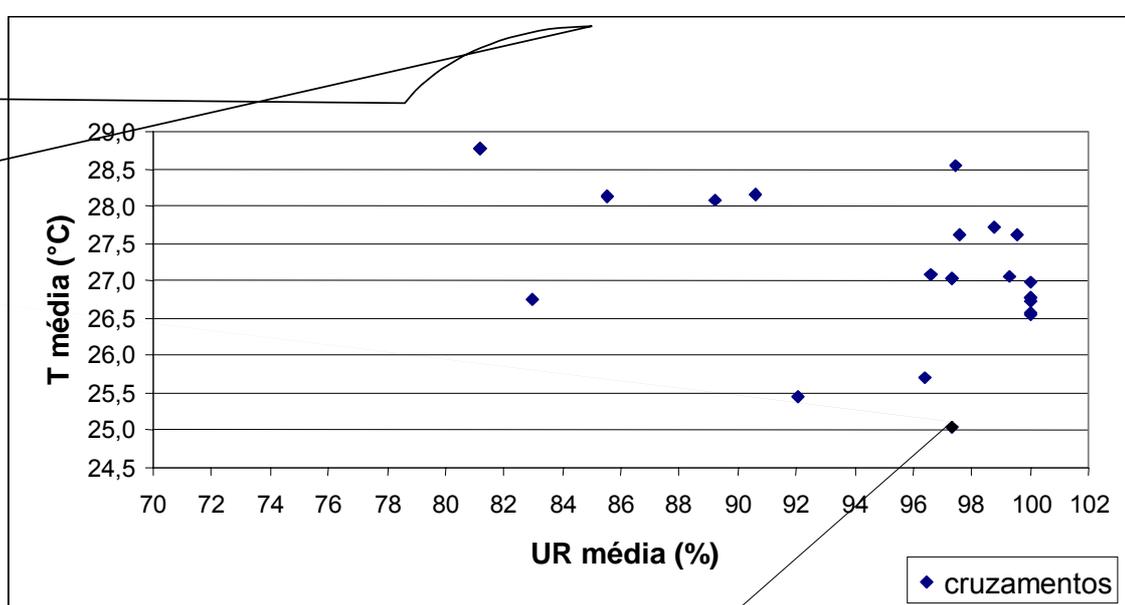
As incidências encontradas nesta e em outras pesquisas foram comparadas e percebeu-se que existe certa variabilidade nos resultados. Cada um dos estudos mostra incidências diferentes; porém os gêneros que apresentaram consistentemente maiores incidências foram: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Curvularia* e *Bipolaris*, na Índia (NARENDRA; SETTY, 1979; SINHA; SINGH, 1982). No Brasil, aqueles mais encontrados foram *Curvularia*, *Bipolaris*, *Phoma* e *Fusarium* (SANGUINO, 1976). Este dado é concordante ao encontrado no presente estudo.

Tabela 8 - Resultado das análises sanitárias de sementes provenientes de 29 cruzamentos do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do CTC dos anos de 2002, 2003 e 2004

Nº cruzamento	Incidência (%)												
	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Bipolaris</i> GM1	<i>Bipolaris</i> GM2	<i>Phoma herbarum</i>	<i>Cladosporium</i> GM1	<i>Cladosporium</i> GM2	<i>Curvularia</i> GM1	<i>Curvularia</i> GM2	<i>Curvularia</i> GM 3	<i>Penicillium</i> sp.	
2002	1	35	2	16	1	0	1	17	0	7	0	0	
	2	15	0	5	1	1	0	2	0	7	1	0	
	3	6	1	21	0	0	1	14	1	3	0	0	
	4	42	1	2	1	0	0	0	0	12	0	4	
	5	9	0	4	3	0	6	17	2	4	0	0	
	6	10	3	2	0	5	2	6	2	46	0	0	
	7	15	0	3	5	1	2	33	6	4	0	0	
Média anual	19	1	8	2	1	2	13	2	12	0	1	0	
2003	8	6	0	16	5	1	0	0	0	33	3	0	
	9	7	0	15	1	1	1	1	0	36	2	1	
	10	10	1	18	2	1	9	7	1	8	0	0	
	11	30	1	35	5	2	6	0	0	25	2	2	
	12	6	0	12	4	0	7	26	2	3	0	1	
	13	6	0	3	0	0	90	0	0	2	0	0	
	14	30	18	11	0	0	4	2	0	19	0	0	
Media anual	14	3	16	2	1	17	5	0	18	1	1	0	
2004	15	26	10	17	2	1	0	0	0	13	2	1	3
	16	33	27	29	2	2	10	0	0	18	2	0	0
	17	21	3	6	0	0	15	7	3	4	0	0	1
	18	39	5	30	0	0	21	3	3	6	0	0	1
	19	35	4	16	0	1	2	14	0	5	0	0	5
	20	27	8	4	0	0	2	1	2	12	1	0	3
	21	15	15	2	0	1	2	8	9	5	0	1	3
	22	20	4	6	1	0	17	8	18	19	2	0	0
	23	14	8	7	1	0	5	4	5	2	0	0	0
	24	8	0	2	1	0	9	17	14	2	2	0	4
	25	10	0	7	0	0	28	25	0	4	0	0	0
	26	10	0	0	0	0	8	26	13	0	0	0	1
	27	14	4	0	0	0	2	22	48	0	0	0	5
	28	16	3	5	0	0	8	15	11	0	0	0	1
	29	5	0	0	0	0	3	0	2	2	0	1	3
Media anual	20	6	9	0	0	9	10	9	6	1	0	2	
Média geral	17	4	10	1	1	9	9	5	10	1	0	1	

Na maioria dos cruzamentos avaliados quanto à sanidade, grande parte das sementes estavam infectadas por mais de um gênero ou por mais de uma espécie, ou grupo morfológico, concomitantemente.

O gráfico, climograma, onde foram plotadas as incidências fúngicas das sementes de 29 cruzamentos de acordo com o ambiente ( $T_{\text{média}} \times UR$ ) onde foram produzidos está na Figura 5. Formaram-se três grupos distintos quanto às condições climáticas.



genéticas das sementes. Talvez essa hipótese possa ser verdadeira com faixas de clima mais espaçadas, diferentemente das ocorridas neste experimento, onde a variação nas áreas de formação das sementes foi pequena.

Tabela 9 – Incidência de fungos em sementes de cana-de-açúcar provenientes de 29 cruzamentos produzidos em ambientes

Grupo Climático	Tmédia (°C)	UR (%)	Incidência média (%)					
			<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Bipolaris</i> GM1	<i>Bipolaris</i> GM2	<i>Phoma herbarum</i>
GC1	26,5-29	80-90	20,2a *	4,6a	8,4a	0,7a	0,4a	5,1a
GC2	25-26	92-97	17a	3,8a	13a	1,6a	0,5a	12,8a
GC3	26,5-28,5	98-100	11,6a	2a	3,6a	1a	1,6a	5,3a
Média total	-	-	16	3	8	1	1	8

Grupo Climático	Tmédia (°C)	UR (%)	Incidência média (%)					
			<i>Cladosporium</i> GM1	<i>Cladosporium</i> GM2	<i>Curvularia</i> GM1	<i>Curvularia</i> GM2	<i>Curvularia</i> GM3	<i>Penicillium</i> sp.
GC1	26,5-29	80-90	7a	5a	7,2a	0,7a	0,6a	1,6a
GC2	25-26	92-97	11a	5a	11a	0,6a	0,33a	0,73a
GC3	26,5-28,5	98-100	13a	5a	16,6a	0a	0a	0,33a
Média total	-	-	10	5	12	0	0	1

\* Médias seguidas por letras iguais nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

GC= grupo climático.

## 2.4 Conclusões

O método considerado mais adequado para a detecção de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar foi placa de Petri de plástico, substrato papel de filtro e incubação por sete dias sob regime de luz alternada (12h luz branca fluorescente/ 12h escuro) e temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Tal método foi o mais econômico, sensível e prático.

Os gêneros fúngicos considerados mais importantes para sementes de cana-de-açúcar foram *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Phoma*, fungos estes,

mais freqüentes e que apresentaram maior

HANLIN, R.T. **Illustrated genera of ascomycetes**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1990. 263 p.

HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1987. 603 p.

LOVELESS, A.R.; SMITH, C.E.M. Seedling blight of sugar-cane: a new disease caused by *Helminthosporium sacchari* Butler. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 44, n. 4, p. 419-424, 1956.

LUCCA FILHO, O. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.

MATHUR, S.B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. Basserdorf: International Seed Testing Association, 2003. 425 p.

NARENDRA, D.V.; SETTY, M.V.N. Seed mycoflora of sugarcane and their importance in nurseries. **Seed Research**, New Delhi, v. 7, n. 2, p. 145-150, 1979.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Micological papers**. Wallingford: CAB International Mycological Institute, 1987. 261 p.

### 3 EFEITOS DE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SEMENTES E PLÂNTULAS.

#### Resumo

Este estudo objetivou avaliar os efeitos que fungos associados às sementes de cana-de-açúcar podem causar às sementes e plântulas. Foram realizadas análises sanitárias e germinação de sementes de 29 cruzamentos, pelo método do papel de filtro, e incubação das sementes por sete dias, sob regime de luz alternada (12h luz branca fluorescente/ 12h escuro) e temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As avaliações foram realizadas em microscópio estereoscópico e foram identificados os fungos encontrados associados às sementes não germinadas, plântulas com necrose de parte aérea e necrose na raiz e plântulas sem sintomas. Observou-se que todos os fungos incidiram, em maiores porcentagens, em sementes não germinadas e que o de maior incidência foi *Fusarium verticillioides* (14,7%), seguido de *Curvularia* GM1 (8%), *Bipolaris sacchari* (7,6%), *Cladosporium* GM1 (7,1%) e *Phoma herbarum* (6,2%). Os demais fungos apresentaram baixas incidências em quaisquer condições avaliadas. A partir da análise sanitária e de germinação de sementes de cana-de-açúcar, concluiu-se que *Bipolaris sacchari* e *Curvularia* GM1 podem ser responsáveis pela não germinação, além de poderem causar sintomas nas plântulas (necróticos na parte aérea e na raiz).

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Efeitos; Fungos; Sementes; Plântulas

### 3.1 Introdução

No melhoramento genético da cana-de-açúcar, o produto gerado do cruzamento de duas variedades são as sementes. São realizados milhares de cruzamentos para obtenção de quantidades de sementes suficientes, que possam ser avaliadas e selecionadas, futuramente gerando poucas variedades comerciais.

Ao plantar as sementes para obtenção de plântulas, há possibilidade de ação de fungos associados a estas que podem levar as plântulas emergidas à morte ou ao aparecimento de sintomas severos, os quais inviabilizarão a exploração de possíveis genótipos de interesse. Esses fungos são beneficiados pela maneira e pelas condições ambientes (alta umidade e temperatura) em que as sementes são produzidas (SANGUINO, 1976). Esses patógenos causam prejuízos significativos em viveiros de plântulas, limitando o sucesso e a rapidez dos programas de melhoramento genético.

Muitas vezes a má germinação ou emergência apresentadas pelas sementes de um determinado cruzamento são atribuídas à infertilidade, à má formação das sementes ou aos patógenos do solo, sem levar em conta a grande quantidade de patógenos que são trazidos pelas próprias sementes (SANGUINO, 1976). Há patógenos que causam a morte dessas sementes ou plântulas, resultando na falta de materiais para futura obtenção de uma boa variedade.

Loveless e Smith (1956), relataram redução de até 50% de plântulas, na Jamaica, por um patógeno associado às sementes de cana-de-açúcar, *Bipolaris sacchari*. Byther e Steiner (1972) relataram a redução de 8% a 31% de plântulas de cana-de-açúcar por patógenos de sementes, na Estação Experimental da Hawaiian Sugar Planters' Association.

Segundo Sanguino<sup>1</sup>, a porcentagem de prejuízos de plântulas por fungos associados às sementes chegam a atingir 100% em determinados cruzamentos, caso não se empreguem medidas de controle (informação verbal). Esses fungos podem ser responsáveis pela má germinação e morte de plântulas, durante a emergência (SANGUINO, 1976). Os patógenos associados às sementes, em geral, agem de diversas maneiras: apodrecendo órgãos de reserva; infectando e lesionando tecidos jovens (sintomas em plântulas); afetando a absorção e transporte de água e nutrientes

---

<sup>1</sup> SANGUINO, A. Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

pela podridão de raízes e obstrução vascular; e reduzindo a realização da fotossíntese e da utilização dos produtos fotossintetizados pela planta (MENTEN, 1991).

As atividades prejudiciais de fungos associados às sementes, no início de desenvolvimento da cana-de-açúcar, têm papel muito importante, de acordo com Sanguino<sup>2</sup>, porque podem resultar no fracasso da obtenção de plantas de cruzamentos importantes, principalmente em países com produção de poucos quilos de sementes (informação verbal). Por isso, são necessários estudos detalhados e sistemáticos sobre a ação de fungos.

Visando contribuir para o desenvolvimento dessa área, este estudo objetivou avaliar, por meio de análise sanitária e germinação, os possíveis efeitos que fungos, associados às sementes de cana-de-açúcar, podem causar em sementes e plântulas.

### **3.2 Material e Métodos**

Por meio da análise sanitária e germinação de sementes de cana-de-açúcar dos 29 cruzamentos apresentados no item 2, Tabela 1, observou-se quais as características das sementes e plântulas que apresentaram incidência fúngica.

Ambas, análise sanitária e germinação, foram baseadas no método do papel de filtro (BRASIL, 1992), que constou na distribuição de 25 sementes em placas de Petri de plástico contendo como substrato três folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada. A incubação das sementes foi feita sob regime de luz alternada (12h luz branca fluorescente/ 12h escuro) por sete dias a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  (temperatura ideal utilizada nos programas de melhoramento para germinação das sementes de cana-de-açúcar). Após esse período cada semente foi avaliada, através de estereomicroscópio e, se necessário, microscópio composto, que permitiu a detecção e identificação dos fungos associados às sementes. Foram verificadas presenças de fungos em sementes não germinadas, em plântulas com necrose na parte aérea, na raiz ou sem sintomas. A identificação dos gêneros e espécies encontrados foi feita por meio de bibliografia especializada (BOOTH, 1971; CHIDAMBARAM; MATHUR; NEERGAARD, 1973; SIVANESAN, 1987; HANLIN, 1990; SINGH et al., 1991; BARNETT; HUNTER, 1998;

---

<sup>2</sup> Id. anterior

MATHUR; KONGSDAL, 2003). O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado e cada tratamento constou de cinco repetições de 50 sementes cada.

Os dados obtidos foram transformados em arco sen  $\sqrt{x / 100}$ , submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.3 Resultados e discussão

Estão presentes nas Tabelas 10 e 11 os fungos detectados em associação com as sementes de cana-de-açúcar e a incidência em sementes não germinadas, em plântulas com necrose na parte aérea, na raiz ou plântulas sem sintomas. Na Figura 6 encontram-se os fungos associados a sintomas em plântulas.

Foram verificadas incidências de: *Bipolaris sacchari*, *Bipolaris* GM1, *Bipolaris* GM2, *Curvularia* GM1, *Curvularia* GM2, *Curvularia* GM3, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum*, *Penicillium* sp. e *Phoma herbarum*. Nessas condições de sementes, as maiores incidências foram de *Fusarium verticillioides*, seguido de *Curvularia* GM1, *Bipolaris sacchari*, *Cladosporium* e *Phoma herbarum*, porém, não ultrapassando 15% de incidência média total. Todos os fungos encontrados apresentaram maiores incidências nas sementes não germinadas, quando comparadas às incidências em plântulas sintomáticas ou plântulas sem sintomas.

Os fungos que apresentaram maiores incidências (acima de 6%) em sementes não germinadas foram *Fusarium verticillioides*, *Bipolaris sacchari*, *Phoma herbarum*, *Cladosporium* GM1 e *Curvularia* GM1. Esses dados indicam que pode haver relação entre presença fúngica e não germinação das sementes.

Observa-se, também, que dentre os fungos mais constantemente associados às sementes não germinadas, há aqueles que apresentaram maiores incidências em plântulas sem sintoma, como o caso de *Fusarium verticillioides*, *Phoma herbarum* e *Cladosporium* GM1. Por meio desse fato, permitiu-se inferir que há probabilidade desses fungos serem menos prejudiciais do que aqueles que apresentaram menores incidências em plântulas sem sintomas. Essa constatação é devido ao fato de que, além da presença desses fungos em maiores quantidades em plântulas sem sintomas, houve pouca ou nenhuma presença desses fungos em plântulas sintomáticas.

Os fungos *Bipolaris sacchari* e *Curvularia* GM1, possivelmente podem ser responsáveis pela não germinação de sementes e por sintomas nas plântulas, pois incidiram com maiores freqüências em sementes não germinadas e quando, em plântulas, mostraram-se associados a sintomas necróticos (necroses na parte aérea ou na raiz).

Os demais fungos apresentaram baixa incidência em quaisquer condições avaliadas.

Entretanto, por meio do presente estudo, apenas podem ser aventadas hipótese quanto ao real efeito prejudicial de *Bipolaris sacchari* e *Curvularia* GM1, não podendo-se afirmar que esses foram os principais causadores da má germinação, pois, segundo Sanguino (1976), a não germinação das sementes de cana-de-açúcar pode ser causada também por outros aspectos como infertilidade ou características genéticas.

Para esclarecer o real prejuízo que os patógenos associados às sementes podem causar, testes de patogenicidade devem ser realizados, completando os Postulados de Koch.

Tabela 10 - Resultado das análises sanitárias e de germinação de sementes provenientes de 29 cruzamentos do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do CTC e verificação da associação de estruturas fúngicas dos fugos *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum*, *Bipolaris sacchari*, *Bipolaris GM1*, *Bipolaris GM2* e *Phoma herbarum* aos sintomas causados em plântulas emergidas

N° cruz	G (%)	Incidência (%)																															
		<i>Fusarium verticillioides</i>					<i>Fusarium semitectum</i>					<i>Bipolaris sacchari</i>					<i>Bipolaris GM1</i>					<i>Bipolaris GM2</i>					<i>Phoma herbarum</i>						
		SNG	NPA	NR	PSS	T	SNG	NPA	NR	PSS	T	SNG	NPA	NR	PSS	T	SNG	NPA	NR	PSS	T	SNG	NPA	NR	PSS	T	SNG	NPA	NR	PSS	T		
2002	1	7	30	0	0	5	35	0	0	0	2	2	10	1	2	3	16	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	2	1	15	0	0	0	15	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	3	13	3	0	0	3	6	1	0	0	0	1	7	4	4	6	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	4	4	38	0	0	4	42	1	0	0	0	1	2	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	5	8	0	0	1	9	0	0	0	0	0	3	0	0	1	4	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	5	0	0	1	6	
	6	8	10	0	0	0	10	3	0	0	0	3	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	2	0	0	0	2	
	7	5	14	0	0	1	15	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3	5	0	0	0	5	1	0	0	0	1	2	0	0	0	2	
2003	8	15	5	0	0	1	6	0	0	0	0	0	6	2	3	5	16	4	0	0	1	5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	9	4	7	0	0	0	7	0	0	0	0	0	1	12	1	1	15	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	
	10	5	9	0	0	1	10	1	0	0	0	1	16	0	0	2	18	2	0	0	0	2	1	0	0	0	1	8	0	0	1	9	
	11	1	28	1	1	0	30	1	0	0	0	1	32	1	2	0	35	5	0	0	0	5	2	0	0	0	2	6	0	0	0	6	
	12	7	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	7	0	0	0	7	
	13	14	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	2	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	42	0	2	46	90	
	14	3	24	1	0	5	30	16	0	0	2	18	10	0	1	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	4	
2004	15	3	23	0	0	3	26	10	0	0	0	10	14	1	0	2	17	2	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	16	3	29	0	0	4	33	26	0	0	1	27	26	0	0	3	29	2	0	0	0	2	2	0	0	0	2	9	0	0	1	10	
	17	3	20	0	0	1	21	3	0	0	0	3	4	1	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	2	15		
	18	3	33	0	0	6	39	5	0	0	0	5	29	0	0	1	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	1	21	
	19	2	33	0	0	2	35	4	0	0	0	4	16	0	0	0	16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	2	
	20	6	23	0	0	4	27	8	0	0	0	8	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2		
	21	7	11	0	0	4	15	13	0	0	2	15	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	2	
	22	7	18	0	0	2	20	4	0	0	0	4	5	1	0	0	6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	12	0	0	5	17	
	23	9	12	0	1	1	14	6	0	0	2	8	4	0	1	2	7	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	2	5	
	24	3	8	0	0	0	8	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	9	0	0	0	9	
	25	11	6	0	0	4	10	0	0	0	0	0	4	1	0	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	10	28	
	26	15	4	1	0	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	2	8	
	27	2	12	1	0	1	14	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	
	28	10	10	2	0	4	16	2	0	0	1	3	4	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	2	0	8	
	29	8	3	1	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	3		
média		6	14,7	0,2	0	2	17	3,4	0	0	0,3	4	7,6	0,9	0,5	1	10	1,1	0	0	0	1	0,6	0	0	0	1	6,2	0	0,1	2,6	9	

Onde: G= germinação; SNG= semente não germinada; NPA= necrose na parte aérea; NR= necrose na raiz; PSS= plântulas sem sintoma ; T= total; N° cruz= número do cruzamento.





Figura 6 - Presença de sintomas associados a fungos encontrados na análise sanitária de sementes de cana-de-açúcar: conídios de *Bipolaris sacchari* em lesão de colo e necrose da raiz (1 e 2); conídios de *Fusarium verticillioides* em lesão fraca na folha (3); conídios e micélio de *Fusarium semitectum* em necrose no colo e morte de plântula (4 e 5); conídios de *Curvularia* GM1 em necrose no colo e lesão fraca na parte aérea (6 e 7)

### 3.4 Conclusões

A partir da análise sanitária e de germinação de sementes de cana-de-açúcar, concluiu-se que *Bipolaris sacchari* e *Curvularia* GM1, associados às sementes, podem ser responsáveis pela não germinação, além de poderem causar sintomas nas plântulas (necróticos na parte aérea e na raiz).

### Referências

- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th. ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1998. 218 p.
- BYTHER, R.S.; STEINER, G.W. Four sugarcane seedling diseases in Hawaii: causal agents, control, and a selective medium for isolation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 120-124, 1972.
- BOOTH, C. **The genus fusarium**. Kew: CAB, 1971. 237 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA; DNDV; CLAV, 1992. 206 p.
- CHIDAMBARAM, P.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. **Identification of seed-borne *Drechslera* species**. Copenhagen: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1973. 207 p.
- HANLIN, R.T. **Illustrated genera of ascomycetes**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1990. 263 p.
- LOVELESS, A.R.; SMITH, C.E.M. Seedling blight of sugar-cane: a new disease caused by *Helminthosporium sacchari* Butler. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 44, n.4, p. 419-424, 1956.
- MATHUR, S.B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. Basserdorf: International Seed Testing Association, 2003. 425 p.
- MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991. 321 p.
- SANGUINO, A. **Patologia e controle dos fungos de sementes de cana-de-açúcar e resistência de progênies à *Helminthosporium sacchari***. 1976. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; MATHUR, S.B. **An illustrated manual on identification of some seed- borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins.** Lyngby: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1991. 133 p.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Micological papers.** Wallingford: CAB International Mycological Institute, 1987. 261 p.

#### 4 PATOGENICIDADE DOS FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR E SINTOMAS CAUSADOS.

##### Resumo

O presente estudo objetivou a verificação da patogenicidade dos fungos mais freqüentes associados às sementes de cana-de-açúcar e dos sintomas que podem causar em plântulas. Foram inoculados 22 fungos de diferentes gêneros, previamente encontrados associados às sementes de cana-de-açúcar, em sementes de alta qualidade fitossanitária. Para produzir inóculo, discos de micélio de cada isolado foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA e posteriormente incubados sob condições controladas (temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e regimes de luz alternada 12h luz branca fluorescente/ 12h escuro) até atingir um valor próximo ao diâmetro total da placa. As sementes foram inoculadas com os fungos pelo método de contato das sementes com meio colonizado, por 24h. A testemunha constou de sementes mantidas em contato apenas com meio BDA. Posteriormente, as sementes foram distribuídas em bandejas brancas plásticas contendo substrato Plantmax® e mantidas em casa de vegetação, variando a temperatura de 28 a  $32^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa em aproximadamente 60% por 10 dias, até a avaliação. Foram realizadas quatro repetições de cada fungo, portanto, quatro bandejas por fungo e o delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado. A avaliação foi feita contando-se o número de plântulas emergidas; sadias; com lesões severas, fracas ou medianas na parte aérea; podridão de raiz; e necrose ou rachadura no colo. *Bipolaris* spp. e *Curvularia* spp. apresentaram alta patogenicidade por causar maior porcentagem de morte de plântulas e de plântulas com sintomas severos; *Fusarium* spp., *Cladosporium* GM1 e um dos isolados de *Phoma herbarum*, mediana patogenicidade por reduzir a emergência e por apresentar sintomas menos severos às plântulas; e *Cladosporium* GM2 e um isolado de *Phoma herbarum* ficaram entre pouco ou não patogênicos, não alterando a emergência e nem mesmo causando sintomas significativamente.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Fungos; Sementes; Patogenicidade

#### SUGARCANE SEEDBORNE FUNGI: PATHOGENICITY AND CAUSED SYMPTOMS.

##### Abstract

The present study had as objective the verification of the pathogenicity of the most frequent sugarcane seedborne fungi and the symptoms that can cause in seedlings. Twenty two fungi of different genera were inoculated, previously found associated to the sugarcane seeds, in seeds of high health quality. To produce inoculum, mycelium discs of each isolate were transferred to the center of PDA medium Petri plates and incubated under controlled conditions (temperature of  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  and 12h alternating cycles of light and darkness) until it reached almost of the total diameter of the plate. The seeds were inoculated with the fungi by the seed contact method with colonized medium for 24h. The control consisted of seeds kept in contact only with PDA medium. Later, the seeds were distributed in white plastic trays contend Plantmax®

substrate and kept in greenhouse, with a temperature variation of 28 to 32°C, with relative humidity of approximately 60% per 10 days, until the evaluation. Four repetitions of each fungi were done, therefore, four trays for fungus and the experimental delineation was at random. The evaluation was made by counting the number of emerged seedlings; healthy; with severe, weak or medium injuries in the aerial part; root necrosis; and necrosis or crack in the neck. *Bipolaris* spp. and *Curvularia* spp. presented high pathogenicity by causing high percentage of seedling death and seedlings with severe symptoms; *Fusarium* spp., *Cladosporium* GM1 and one of the isolates of *Phoma herbarum*, presented medium pathogenicity, by reducing the emergency and to present less severe seedlings symptoms; and *Cladosporium* GM2 and one isolate of *Phoma herbarum* were considered between little or not pathogenic, not modifying the emergency and not even causing symptoms significantly.

Key-words: Sugarcane; Seedborne fungi; Seeds; Pathogenicity

#### 4.1 Introdução

Um dos fatores limitantes na produção das sementes de cana-de-açúcar é a grande quantidade de organismos patogênicos, principalmente fungos, associados a essas, que são beneficiados pela maneira e pelas condições ambientes (altas umidade e temperatura) em que são produzidas. Estes fungos podem ser responsáveis pela má germinação e por grande parte da morte de plântulas, durante a germinação e emergência (SANGUINO, 1976).

Os patógenos de sementes agem de diversas maneiras, como: apodrecendo órgãos de reserva; infectando e lesionando tecidos jovens; causando sintomas em plântulas; afetando a absorção e transporte de água e nutriente pela podridão de raízes e obstrução vascular; e reduzindo a realização da fotossíntese e da utilização dos produtos fotossintetizados pela planta (MENTEN, 1991).

Prejuízos de 8% a 31% de plântulas de cana-de-açúcar por patógenos de sementes foram relatados por Byther e Steiner (1972), na estação experimental da Hawaiian Sugar Planters' Association.

No Brasil, a porcentagem de redução de plântulas viáveis, devido a fungos associados às sementes, pode atingir 100% em determinados cruzamentos, caso não sejam tomadas medidas de controle, segundo Sanguino<sup>1</sup> (informação verbal). Tais prejuízos, no início do desenvolvimento da cana-de-açúcar, têm um papel muito importante, pois, geralmente resultam em fracasso na obtenção de plântulas de

cruzamentos importantes. Tais ocorrências são ainda mais significativas em países com produção de poucos quilos de sementes. Tendo em vista essas reduções no início do desenvolvimento da cana-de-açúcar, são necessários estudos detalhados e sistemáticos sobre este assunto.

Sanguino (1976) relatou que as principais espécies patogênicas foram: *Curvularia lunata*, causando mancha nas folhas e no colo e morte das plântulas; *Fusarium verticillioides*, causando mancha no colo, podridão de raízes e morte das plântulas e *Bipolaris sacchari* e *H. rostratum*, causando mancha nas folhas e no colo.

Patógenos associados às sementes de cana-de-açúcar também foram estudados por Byther e Steiner (1972). Esses pesquisadores encontraram *Bipolaris rostrata*, *B. hawaiiensis*, *Curvularia lunata* e *Curvularia senegalensis* nas sementes e avaliaram a patogenicidade dos fungos por meio de experimento em casa de vegetação. Semearam em solo pré-tratado com brometo de metila e inocularam-nas, pulverizando suspensão de esporos de cada um dos fungos durante a semeadura. Vários sintomas foram notados, como lesões localizadas nas sementes, caules, folhas e raízes.

Loveless e Smith (1956) encontraram *Nigrospora* sp. associado às sementes de cana-de-açúcar, juntamente com *Bipolaris* sp. Sugeriram que o parasitismo de *Nigrospora* sp. é fraco em relação ao de *Bipolaris* sp. Sementes com alta germinação e baixa porcentagem de plântulas, apresentando requeima, foram colocadas em contato com o meio agar-água colonizado pelo fungo *Bipolaris* sp. e semeadas em solo esterilizado. Este fungo se apresentou altamente patogênico, causando requeima das plântulas e, mais tarde, a morte.

Em testes de patogenicidade de fungo associado a sementes de algodão, Tanaka e Menten (1991) compararam três métodos de inoculação de sementes: método do contato entre as sementes e a colônia do fungo por 24 h em temperatura ambiente e secagem das sementes por 24 h; imersão das sementes em suspensão de conídios durante 30 min e secagem por duas horas; e imersão das sementes em suspensão de conídios durante 2 h e secagem por 16 h. O método que apresentou superioridade na obtenção das sementes infectadas foi o primeiro dos citados anteriormente. Esses mesmos autores implicam a importância da inoculação das

---

<sup>1</sup>SANGUINO, A. Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

sementes, que, além de garantir a associação sintomatologia com o agente causal, possibilita estudos como patogenicidade dos fungos, resistência do hospedeiro, entre outros.

Esse mesmo método de inoculação, por contato entre sementes e colônia de fungos, também foi empregado por Parisi; Menten e Martins (1999), em sementes de soja.

Diante da situação apresentada, o presente estudo teve como objetivo verificar a patogenicidade dos fungos mais freqüentes e os sintomas que podem causar.

#### **4.2 Material e Métodos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ – USP e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Tecnologia Canavieira, em Piracicaba-SP.

Os fungos empregados foram os isolados previamente, em levantamento dos fungos associados e da incidência em sementes de cana-de-açúcar, provenientes de plantas híbridas produzidas no programa de melhoramento genético, realizado em 2004, na Estação Experimental do CTC, com sede em Camamú (BA).

#### **Avaliação da patogenicidade dos fungos associados às sementes de cana-de-açúcar**

Diferentemente do teste de sanidade, no qual se observaram os sintomas em sementes naturalmente infectadas ou infestadas, este teste indica se sementes infectadas pelos diferentes fungos podem causar baixa emergência e gerar plântulas com sintomas característicos.

Selecionou-se uma amostra dividida em sub-amostras, com sementes provenientes de diferentes cruzamentos, de alta qualidade fitossanitária, encontrados na análise de sanidade realizada anteriormente. Com as sementes dessa amostra foi realizado um ensaio prévio para conhecer quantas plântulas emergiam por grama de semente plantada.

A quantidade de 0,25 g foi estipulada como ideal para a instalação de cada parcela experimental, emergindo aproximadamente 200 plântulas.

Neste teste, os isolados utilizados foram aqueles que apresentaram maior incidência nas análises sanitárias realizadas no item 2 (Tabela 12).

Tabela 12 – Isolados de cada espécie fúngica utilizados para avaliação de patogenicidade

<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Phoma herbarum</i>
BSSC01	B01SC01	CV01SC01	FVSC08	FSSC05	CL01SC01	PHHSC03
BSSC02	B01SC02	CV01SC02	FVSC09	FSSC06	CL01SC03	PHHSC04
	B02SC01	CV02SC01			CL02SC01	
	B02SC02	CV02SC03			CL02SC02	
		CV03SC02				
		CV03SC03				

Para produção do inóculo, discos de micélio de cada isolado foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA e posteriormente incubados sob condições controladas (temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e regimes de luz alternada 12h luz branca fluorescente/ 12h escuro) até atingir um valor próximo ao diâmetro total da placa.

As sementes foram inoculadas com os fungos pelo método descrito por Tanaka e Menten (1991), modificado. As sementes de cada parcela experimental foram mantidas por 24h em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) colonizado pelos fungos, sob condições controladas (temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e regimes de luz alternada 12h luz branca fluorescente/ 12h escuro). Essas condições experimentais permitiram maior contato entre as sementes e o inóculo. A testemunha constou de 0,25 g de sementes de cana-de-açúcar mantidas em contato apenas com meio BDA, nas mesmas condições das demais inoculações. Posteriormente, as sementes foram retiradas das placas colonizadas e semeadas em bandejas brancas plásticas, de área 20 cm x 30 cm, de fundo furado para drenar possíveis excessos de água de irrigação no substrato. O substrato utilizado foi do tipo Plantmax® - estacas ornamentais da EUCATEX. Tal substrato era estéril e foi irrigado antes da semeadura até se aproximar da “capacidade de campo”. Cada caixa constou de uma repetição. Foram realizadas quatro repetições de cada fungo, portanto quatro bandejas por fungo.

As bandejas semeadas foram mantidas em casa de vegetação, variando a temperatura de 28 a 32°C, com umidade relativa em aproximadamente 60% por 10 dias, até a avaliação.

A avaliação foi feita contando-se o número de plântulas emergidas (emersão do coleóptilo e da folha primária); sadias; com lesões severas, fracas ou medianas na parte aérea; podridão de raiz; e necrose ou rachadura no colo.

Os dados obtidos foram transformados em arco sen  $\sqrt{x / 100}$  e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.3 Resultados e discussão

Na Tabela 13 estão os resultados da ação de 22 isolados, dos cinco diferentes gêneros com incidência mais consistente nas sementes. De acordo com o isolado fúngico inoculado, foram observadas diferentes ações sobre a porcentagem de emergência de plântulas totais, de plântulas sem sintomas, e de plântulas com sintomas, que ocorreram nas sementes inoculadas com os diferentes fungos. Os sintomas das plântulas foram classificados como: fracos, médios ou severos, quando na parte aérea; rachadura ou necrose, quando no colo; e necrose na raiz, como ilustrados na Figura 7.

Tabela 13 – Teste de patogenicidade de fungos isolados de semente de cana-de-açúcar por meio de inoculação de sementes por contato com a colônia fúngica

(continua)

Isolado	Emergência (%)	Plântulas (%)		Tipos de sintomas (%)**					
				Parte aérea			Colo		Raiz
		Sem sintomas	Com sintomas	Fraco	Médio	Severo	Rachadura	Necrose	Necrose
Testemunha	100a *	88a	12g	5	0	1	6	1	0
BSSC01	29de	38cdef	62abcde	42	16	8	21	40	3
BSSC02	30cde	19ef	81abcd	47	14	8	29	40	6
B01SC01	23e	20def	80abcd	33	24	16	21	47	1
B01SC02	28de	24def	76abcd	48	13	7	22	37	4
B02SC01	53abcde	17def	83abc	8	3	9	22	51	6
B02SC02	37bcde	25def	75abcd	10	2	25	22	31	5
CV01SC01	40bcde	30bcdef	70abcd	11	0	7	31	28	3

Tabela 13 – Teste de patogenicidade de fungos isolados de semente de cana-de-açúcar por meio de inoculação de sementes por contato com a colônia fúngica

	(conclusão)								
CV01SC02	28de	15ef	85abc	19	3	14	27	41	0
CV02SC01	79ab	26def	74abcd	6	0	6	39	22	1
CV02SC03	42bcde	43abcde	57bcde	10	0	8	25	19	4
CV03SC02	2f	0g	100a	16	11	7	23	72	15
CV03SC03	30cde	9fg	91ab	17	4	10	34	42	2
FSSC05	46bcde	75ab	25fg	1	0	0	20	5	1
FSSC06	62abcd	89a	11g	0	0	0	7	2	2
FVSC08	39bcde	69abc	31efg	1	0	1	20	5	5
FVSC09	47bcde	75ab	25fg	0	0	12	7	4	1
CL01SC01	102a	83a	17g	2	1	6	9	2	2
CL01SC03	101a	69abc	31efg	1	0	0	28	1	1
CL02SC01	72ab	53abcd	47def	5	2	5	24	10	1
CL02SC02	67abc	49abcde	51cdef	4	0	0	42	3	2
PHHSC03	61abcd	82a	18g	0	0	2	14	1	1
PHHSC04	54bcde	88 <sup>a</sup>	12g	0	0	5	5	1	1
CV (%)	15,95	19,74	12,85	-	-	-	-	-	-

\* Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Excluídos da análise de variância.

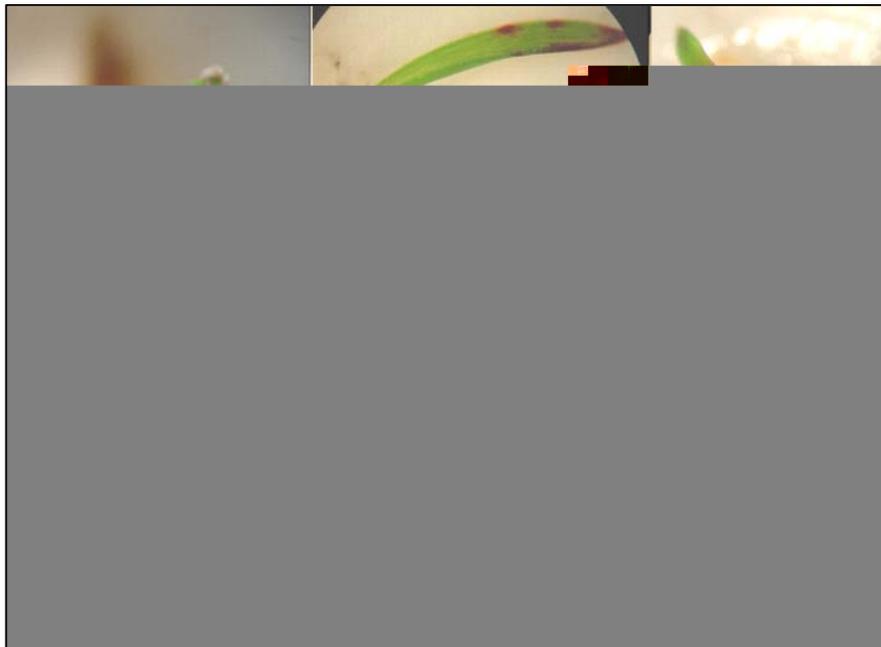


Figura 7 – Sintomas observados em plântulas emergidas em teste de sanidade e germinação de sementes: sintomas na parte aérea: fraco (1); médio (2); severo (3); no colo – rachadura (4); necrose (5); necrose na raiz (6); plântula morta (7 e 8); e plântula sadia (9 e 10)

É importante salientar que as condições deste teste são hipotéticas, nas quais todas as sementes foram infectadas ou infestadas pelos fungos, o que não ocorre na natureza.

A patogenicidade dos fungos foi classificada em alta, média e pouca/ não patogênico.

Pelas duas variáveis analisadas, constatou-se que existe diferença de patogenicidade entre gêneros, dentro espécies ou grupos morfológicos e entre seus isolados.

Os fungos considerados de alta patogenicidade foram *Curvularia* e *Bipolaris*, dos quais todos os isolados comparados diminuíram a emergência de plântulas. Em relação aos sintomas na parte aérea, colo e raiz, pelos dados da Tabela 13, verificou-se que houve maiores porcentagens de sintomas fracos do que médios e severos na parte aérea, necrose no colo e na raiz, para ambos os gêneros. Plântulas que apresentaram sintomas fracos e severos, provavelmente, não serão capazes de se recuperar das infecções. Neste sentido, *Curvularia* e *Bipolaris* foram os gêneros responsáveis pelas maiores porcentagens destas variáveis.

Esses resultados complementam aqueles descritos em literatura, que relatam esses gêneros como patogênicos às sementes e plântulas de SC (SANGUINO, 1976; LOVELESS; SMITH, 1956; BYTHER; STEINER, 1972).

*Cladosporium* GM2, *Fusarium verticillioides*, PHSC04 e FSSC05 foram considerados medianamente patogênicos. *Cladosporium* GM2 não reduziu significativamente a emergência das plântulas, mas causou aparecimento de grande quantidade de rachaduras no colo.

PHSC04 reduziu a emergência das plântulas e não produziu sintomas significativos. Dados semelhantes foram relatados por Sanguino (1976). Os isolados PHSC03 e *Cladosporium* GM1 foram considerados pouco patogênicos/ não patogênicos.

É importante salientar que a variável mais importante para a patogenicidade é a porcentagem de emergência, pois esta não pode ser modificada, ao contrário dos sintomas fracos, que podem ser recuperados e não afetar a formação de plantas vigorosas.

#### **4.4 Conclusões**

Dentre os gêneros fúngicos mais freqüentes, os de maior patogenicidade foram *Curvularia* e *Bipolaris*, causadores de sintomas fracos a severos na parte aérea, rachadura e necrose no colo e necrose de raiz. Esses fungos, quando associados às sementes de cana-de-açúcar, podem causar sérios prejuízos no desenvolvimento de programas de melhoramento genético.

*Cladosporium* GM2, *Fusarium verticillioides* e um dos isolados de *Fusarium semitectum* e outro de *Phoma* foram considerados medianamente patogênicos, enquanto *Cladosporium* GM1 e um dos isolados de *Phoma* foram considerados pouco patogênicos/ não patogênicos.

A partir dessas constatações é possível concluir que o tratamento químico em sementeiras deve se dirigir à inibição desses fungos mais ou medianamente patogênicos.

## Referências

BYTHER, R.S.; STEINER, G.W. Four sugarcane seedling diseases in Hawaii: causal agents, control, and a selective medium for isolation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 120-124, 1972.

LOVELESS, A.R.; SMITH, C.E.M. Seedling blight of sugar-cane: a new disease caused by *Helminthosporium sacchari* Butler. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 44, n.4, p. 419-424, 1956.

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991. 321 p.

PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M.; MARTINS, M.C. Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 25-30, 1999.

SANGUINO, A. **Patologia e controle dos fungos de sementes de cana-de-açúcar e resistência de progênies à *Helminthosporium sacchari***. 1976. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 17, n. 3/4, p. 218-231, 1991.

## 5 CONTROLE DE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DE FUNGICIDAS.

### Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a fungitoxicidade *in vitro* de isolados de fungos patogênicos freqüentemente associados às sementes de cana-de-açúcar, a eficiência e a fitotoxicidade *in vivo* para determinar o controle mais adequado para obtenção de plântulas apropriadas. No teste de fungitoxicidade *in vitro* foram comparados os fungicidas: carbendazim + tiram; carboxina + tiram; fludioxonil + metalaxil- M; mancozeb + metalaxil- M; triadimenol; iprodiona; captana; tolilfluanida e pencicuum. Foram estabelecidas as concentrações de 1, 10 e 100 ppm para a realização dos testes e a eficiência dos fungicidas foi comparada mediante avaliação da inibição do crescimento da colônia em meio de cultura e cálculo da ED<sub>50</sub> (concentração que inibe em 50% o crescimento micelial do fungo). A fitotoxicidade foi determinada em experimento envolvendo a aplicação dos fungicidas selecionados como eficientes ou moderadamente eficientes para a maioria dos isolados avaliados no experimento de fungitoxicidade *in vitro*, e além desses, foram incluídos mancozeb + metalaxil-M e tiram, que já foram utilizados pelo programa de melhoramento do Centro de Tecnologia Canaveira (CTC). Os produtos foram aplicados em sementeira por meio de uma única pulverização. Na avaliação, as variáveis observadas foram o número de plântulas emergidas, altura da parte aérea e da raiz dessas plantas, sintomas de necrose na parte aérea, colo e raiz e observação de possíveis anomalias. Após encontrar o melhor fungicida, eficiente e não fitotóxico, foi realizada validação do método na rotina. Para tal, utilizaram-se sementes com incidência fúngica natural. O fungicida fludioxonil + metalaxil-M apresentou o único altamente eficiente a todos os fungos avaliados, e triadimenol variou de altamente eficiente a medianamente eficiente no controle da maioria desses fungos. Na avaliação *in vivo*, fludioxonil + metalaxil-M nas doses de 7,35;10,5 e 13,65 g/100L; seguido de triadimenol na dose de 31,5 g/100L não causaram fitotoxicidade às sementes e plântulas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Fungos; Sementes; Controle; Fungicidas

## CONTROL OF SUGARCANE SEEDBORNE FUNGI BY FUNGICIDES

### Abstract

The present study had as objective to evaluate the *in vitro* fungitoxicity of frequently pathogenic seedborne fungi to sugarcane, the efficiency and *in vivo* phytotoxicity to determine the most adequate control to obtain appropriate seedlings. In the *in vitro* fungitoxicity test, the following fungicides were compared: carbendazim + tiram; carboxina + tiram; fludioxonil + metalaxil- M; mancozeb + metalaxil- M; triadimenol; iprodiona; captana; tolilfluanida and pencicuum. The concentrations of 1, 10 and 100 ppm were established for the accomplishment of the tests and the fungicides' efficiency was compared by the evaluation of the colony growth's inhibition in

culture medium and calculation of ED50 (concentration that inhibits in 50% the fungi mycelial growth). The phytotoxicity was determined in experiment having involved the application of the fungicides selected as efficient or moderately efficient for the majority of the evaluated isolates in the *in vitro* fungitoxicity experiment, and beyond these, mancozeb + metalaxil-M and tiram were included, because their already had been used by the breeding program of the Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). The products were applied in nurseries by an only spraying. In the evaluation, the observed variables were the number of emerged seedlings, height of the aerial part and the root of these plants, symptoms of necrosis in the aerial part, neck and root, and observation of possible anomalies. After defined the best fungicide, efficient and not phytotoxic, the validation of the routine method was done. For this, seeds with natural fungical incidence were used. The fludioxonil + metalaxil-M fungicide was the only one highly efficient to all the evaluated fungi, and triadimenol varied from highly efficient to medium efficient to control the majority of these fungi. In *in vivo* evaluation, fludioxonil + metalaxil-M in the doses of 7,35; 10,5 and 13,65 g/100L; followed by triadimenol in the dose of 31,5 g/100L did not caused phytotoxicity to seeds and seedlings.

Key-words: Sugarcane; Seedborne fungi; Seeds; Control; Fungicides

## 5.1 Introdução

A cultura da cana-de-açúcar tem grande importância mundial, utilizada principalmente para obtenção de açúcar e de álcool etílico (FIGUEIREDO et al., 1998). Segundo dados da FNP Consultoria & Comércio (2004), há tendência futura de crescente demanda desses dois produtos. A redução das reservas mundiais de petróleo e o provável aumento do seu custo podem definir a preferência internacional pelo álcool como combustível. Quanto ao açúcar, o forte crescimento econômico da Ásia deve aumentar a renda de quase metade da população do mundo e, como consequência, haverá maior demanda de açúcar, exigindo um crescente aumento de sua produção.

Um dos caminhos para aumentar o rendimento da cana-de-açúcar são os estudos que propõem métodos de melhoramento genético da cultura.

O melhoramento genético convencional da cana-de-açúcar se inicia pela escolha dos parentais de interesse e obtenção de sementes verdadeiras (cariopses) pela hibridização (SILVA et al., 1999). Essas sementes são produtos de cruzamentos entre cultivares comerciais e/ou clones pré-comerciais. Tais cruzamentos geram populações com alta variabilidade genética devido a heterozigose dos clones (NARENDRA; SETTY, 1979; BRESSIANI, 2001). As sementes provenientes dos cruzamentos darão origem a plântulas que serão transplantadas, com aproximadamente 15 dias, para bandejas maiores. Posteriormente, as plântulas mais vigorosas, preferencialmente sem manchas

foliares e com desenvolvimento satisfatório, serão selecionadas, visando as seleções nas próximas fases.

As plântulas afetadas por fungos morrem de três a quatro dias após a emergência, segundo Byther e Steiner (1972). As plântulas que resistirem até dois ou três semanas de idade, na presença dos patógenos, podem se tornar viáveis, isto é, a doença não é mais fatal, embora o vigor das mesmas diminua.

No entanto, segundo Sanguino (1976), os fungos que se encontram nas sementes atuam indiscriminadamente tanto em plântulas, que no futuro formam plantas suscetíveis, quanto naquelas que formam plantas resistentes. Na idade juvenil de plântula, a cana-de-açúcar parece não possuir resistência definida. Plântulas que poderiam gerar futuras variedades, resistentes aos principais patógenos e com características comerciais desejáveis, podem morrer antes mesmo de serem submetidas à seleção.

Comprovada a influência dos fungos associados às sementes na produção de plântulas para o melhoramento genético, há necessidade de se efetuar o controle dos patógenos, com o propósito de obter mudas adequadas.

As três modalidades mais importantes de controle são: químico (consiste na incorporação de produtos químicos, artificialmente desenvolvidos, às sementes), físico (consiste em expor as sementes à ação do calor ou de outro agente físico controlado) e biológico (baseado na incorporação de organismos antagonistas às sementes), de acordo com Machado (2000). Embora existam essas três modalidades para o controle de patógenos associados às sementes de cana-de-açúcar, atualmente o método mais utilizado é o químico. Mesmo sendo o mais usado, ainda existe grande carência de estudos sobre ele.

O tratamento de sementes é um dos métodos mais baratos de controle direto de doenças nos vegetais, baseando-se nos princípios de erradicação, proteção e terapia. Esse tipo de tratamento visa eliminar os patógenos de sementes e/ou proteger as sementes e as plântulas dos patógenos do solo. Essa proteção é importante, pois garante maior população de plântulas sadias e evita a disseminação dos microrganismos (SOAVE; MORAES, 1987).

Mesmo o tratamento de sementes sendo de grande valia, algumas vezes, sua utilização prática pode ser inviável, como no caso de sementes de cana-de-açúcar. No programa de melhoramento são realizados centenas de cruzamentos diariamente e cada um desses cruzamentos possui poucos gramas de sementes e esses teriam de ser tratados separadamente, o que tornaria esse processo extremamente demorado e envolveria grande mão de obra, portanto, impraticável em uma rotina. Na prática, o que se tem feito nesses programas é a pulverização de fungicidas no substrato após a semeadura, com o cuidado de a calda que atinja todas as sementes.

Como se observa, ainda há carência de estudos a respeito de quais os melhores fungicidas atuais que controlem fungos patogênicos associados às sementes de cana-de-açúcar.

Visando conhecer um pouco mais desse controle, Sanguino (1976) comparou os fungicidas benomil, tiram, 2-tiocianometil benzotiazol, mancozeb, brometo de metila, cloreto de 2-metoxietilmercurio e várias dosagens de formol. Constatou que todos os tratamentos foram prejudiciais às sementes e/ ou plântulas de cana-de-açúcar, com exceção do tratamento com o fungicida tiram, na dose de 2,0 g/L (imersão por 20 min). Com esse último tratamento obteve resultados significativos no controle de todos os fungos presentes nas sementes, quando comparado à testemunha, que não recebeu nenhum tratamento. Além disso, tiram aumentou o vigor das sementes, permitindo rápida emergência. Os demais fungicidas e dosagens apresentaram controle apenas parcial dos fungos encontrados.

Byther e Steiner (1972) avaliaram o controle de *Curvularia* spp. e *Bipolaris* spp. com os produtos panogen (metil-mercuridiciandiamida) e calda bordalesa. Nenhum desses dois produtos foi eficiente no controle de nenhuma das espécies desses gêneros empregadas no estudo.

Contudo, há dificuldade de se encontrar algum fungicida que seja de amplo espectro quanto aos diversos gêneros (SANGUINO, 1976) e que não tenha efeito fitotóxico, inclusive não afete o vigor da plântula.

Novos fungicidas vêm sendo lançados, segundo Menten et al. (2005); os empregados em tratamento de sementes evoluíram entre as décadas de 1960 e 1990, com conseqüente redução na dose da ordem de 89,9%. Por exemplo, na década de

1960 havia produto que exigia dose de 450 g i.a./100 kg de sementes e na década de 90, apenas 1 g i.a./100 kg. Quanto à classe toxicológica e à toxicidade oral aguda, não houve alterações marcantes entre os produtos lançados na década de 1960 e nas posteriores.

Atualmente, no Brasil, estão registrados 440 ingredientes ativos de produtos fitossanitários, correspondendo a 1.002 produtos comerciais. Desses, 33 ingredientes ativos são registrados para tratamento de sementes, entre eles, 21 fungicidas. Com esses 21 ingredientes ativos, há 36 produtos comerciais registrados (MENTEN et al., 2005).

Tendo em vista a escassez de trabalhos recentes sobre controle de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar com fungicidas, o objetivo deste estudo foi avaliar a fungitoxicidade *in vitro* de isolados de fungos patogênicos freqüentemente associados às sementes de cana-de-açúcar e a eficiência e a fitotoxicidade *in vivo* para determinar o controle mais adequado para obtenção de plântulas apropriadas. Este objetivo foi definido com o propósito de auxiliar os programas de melhoramento genético, aumentando a germinação das sementes, a emergência e a obtenção de plântulas que irão representar os cruzamentos efetuados, durante os estádios de seleção de novos clones de cana-de-açúcar.

## **5.2 Material e Métodos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ – USP e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Tecnologia Canavieira em Piracicaba-SP.

### **5.2.1 Fungitoxicidade *in vitro***

O teste de fungitoxicidade *in vitro* foi realizado visando obter informações preliminares de quais são os fungicidas eficientes ou moderadamente eficientes na inibição dos fungos patogênicos mais freqüentemente encontrados associados às sementes de cana-de-açúcar, para posterior utilização destes fungicidas na avaliação da fitotoxicidade *in vivo*.

Foram comparados nove fungicidas comerciais (Tabela 14) de diferentes grupos químicos, tanto usados para tratamento de sementes como para parte aérea. Foram estabelecidas as concentrações de 1, 10 e 100 ppm para a realização dos testes.

Tabela 14 - Fungicidas comparados quanto à eficiência *in vitro* para controle de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar

Nome técnico	Produto comercial	Grupo químico	Modo de ação	Formulação <sup>1</sup>	Concentração do i.a. (g/kg ou g/L)
Carbendazim + tiram	Derosal Plus	Benzimidazol+ Dimetilditiocarbamato	sistêmico+ protetor	SC	150+350
Carboxina + tiram	Vitavax-Thiram 200 SC	Carboxanilida+ Dimetilditiocarbamato	sistêmico+ protetor	SC	200+200
Fludionoxil + metalaxil-M	Maxim XL	Fenilpirrol+ Acilalaninato	protetor + sistêmico	SC	25+10
Mancozeb + metalaxil-M	Ridomil-Mancozeb	Dimetilditiocarbamato + Acilalaninato	sistêmico+ protetor	PM	640 + 80
Triadimenol	Baytan SC	Triazol	sistêmico	SC	150
Iprodiona	Rovral SC	Dicarboximida	protetor	SC	500
Captana	Captan Fersol 500 PM	Dicarboximida	protetor	PM	200
Tolilfluorida	Euparem M 500 PM	Fenilsulfamida	protetor	PM	500
Pencicuirom	Monceren PM	Feniluréia	protetor	PM	250

<sup>1</sup> PM= pó molhável.

SC= suspensão concentrada.

Os isolados utilizados foram dois de cada gênero ou espécie considerado mais patogênico e pelo menos um daqueles considerados de mediana patogenicidade (Tabela 15). Os isolados considerados pouco patogênicos/ não patogênicos não foram utilizados neste teste.

Tabela 15 - Isolados de fungos patogênicos associados às sementes de cana-de-açúcar submetidos a fungitoxicidade *in vitro*

(continua)						
<i>Bipolaris sacchari</i>	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Phoma herbarum</i>
BSSC01	B01SC01	CV01SC01	FVSC08	FSSC05	CL02SC02	PHHSC04
BSSC02	B01SC02	CV01SC02	FVSC09			

Tabela 15 - Isolados de fungos patogênicos associados às sementes de cana-de-açúcar submetidos a fungitoxicidade *in vitro*

		(conclusão)
B02SC01	CV02SC01	
B02SC02	CV02SC03	
	CV03SC02	
	CV03SC03	

Para produção do inóculo, fragmentos de micélio de cada isolado (cultura pura) foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA e posteriormente incubados sob condições controladas (temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e regimes de luz alternada 12h luz branca fluorescente/ 12h escuro) até a colonização do fungo atingir próxima ao diâmetro total da placa.

Para o preparo do meio de cultura com fungicida, cada produto foi adicionado a meio de cultura BDA, segundo técnica de Mondal et al. (2005) e Frare (2005). Cada produto utilizado foi diluído em água destilada autoclavada, sob fluxo laminar. Primeiro foi feita uma suspensão estoque I para cada fungicida, de 1 g de i.a. do produto comercial em 99 mL de água, obtendo-se a concentração de 10.000 ppm. A partir desta solução estoque, foram feitas diluições em série, transferindo-se 1 mL da solução estoque para 9 mL de água, obtendo-se a solução estoque II (1.000 ppm), e transferindo-se 1 mL da solução II para 9 mL de água, obtendo-se a solução estoque III (100 ppm). De cada uma dessas soluções estoques, foi retirado 2,5 mL e transferido para 250 mL de meio BDA fundente ( $45-47^{\circ}\text{C}$ ), diluindo mais 100 vezes cada uma das soluções estoques, obtendo-se assim, meios nas diluições de 1, 10 e 100 ppm dos fungicidas.

Discos de micélio de 5 mm de diâmetro de crescimento ativo em meio BDA foram transferidos para o centro das placas de Petri com meio BDA com os fungicidas. As testemunhas consistiram de discos de micélio colocados em meio BDA sem fungicida. A incubação ocorreu sob condições controladas (temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e regimes de luz alternada 12 h luz branco fluorescente /12 h escuro).

Cada tratamento foi representado por quatro placas de Petri (quatro repetições) com três concentrações de cada um dos fungicidas comparados e mais a testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado.

A avaliação foi realizada quando a colonização das placas testemunhas atingiu próximo ao diâmetro total das placas (8,2 cm), o que levou de cinco a sete dias, variando conforme o isolado. Para o isolado CL02SC02, apesar de seu crescimento não ter atingido nem a metade da placa aos 10 dias de incubação, este foi avaliado, para que não houvesse ressecamento do meio de cultura.

Com o auxílio de uma régua, mediram-se, em dois sentidos perpendiculares, os diâmetros da colônia de cada placa de Petri, com os respectivos produtos e concentrações, comparando-os ao crescimento médio das testemunhas. Assim, calculou-se o valor da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) (MENTEN et al., 1976).

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

Após serem calculados todos os PICs das concentrações, estes foram plotados em uma escala de probabilidade contra o log da concentração do fungicida para determinar a ED<sub>50</sub> (concentração do ingrediente ativo do fungicida necessária para inibir em 50% o crescimento micelial do fungo) (MONDAL et al., 2005). Posteriormente, uma reta intermediária (linha de tendência), entre os três pontos (correspondentes às concentrações 1, 10 e 100 ppm), foi traçada. Foram encontradas equações de regressão entre PIC e log da concentração do fungicida, que permitiram o cálculo da ED<sub>50</sub> de cada produto/ fungo. A ED<sub>50</sub> equivale ao log da concentração correspondente à PIC de 50%.

Os fungicidas avaliados foram classificados em quatro categorias de eficiência, segundo a escala de Bollen e Fuchs (1970), Edgington et al. (1971) e Kataria e Grover (1978):

- ED<sub>50</sub> <1 ppm      - altamente eficiente (AE)
- ED<sub>50</sub> 1-10 ppm    - moderadamente eficiente (ME)
- ED<sub>50</sub> 10-50 ppm   - pouco eficiente (PE)
- ED<sub>50</sub> >50 ppm    - ineficiente (I)

### 5.2.2 Fitotoxicidade de fungicidas às sementes/ plântulas de cana-de-açúcar

As sementes utilizadas foram provenientes de plantas híbridas produzidas no programa de melhoramento realizado em 2004, na Estação Experimental do CTC, com sede em Camamú (BA) e foram semibeneficiadas, retirando os pêlos e ficando apenas a cariopse envolta pelas pálea e lema.

Para este estudo foi constituída uma amostra sementes, formada de uma mistura de materiais de alta germinação (SP924164; SP012431; IASP973314; SP012426; SP004348 e CTC00749 x SP891117), independentemente da incidência fúngica. A germinação considerada para a escolha dos cruzamentos foi a encontrada nos testes prévios do programa de melhoramento genético do CTC; após a formação da amostra composta, foi realizado ensaio prévio, em substrato esterilizado do tipo Plantmax®-estacas ornamentais da EUCATEX, para se conhecer quantas plântulas emergiam por grama de semente.

A quantidade de 0,25 g de semente foi estipulada como ideal para a instalação de cada parcela experimental, emergindo aproximadamente 200 plântulas.

A fitotoxicidade foi determinada em experimento envolvendo a aplicação dos fungicidas selecionados como eficientes ou moderadamente eficientes para a maioria dos isolados avaliados no experimento de fungitoxicidade *in vitro*, e além desses, foram incluídos Ridomil Mancozeb e Rhodiauram SC, que já foram utilizados pelo programa de melhoramento do CTC.

Foram comparadas três concentrações de calda para cada fungicida: a provavelmente adequada, 30% abaixo e 30% acima (Tabela 16).

Tabela 16 - Fungicidas utilizados para avaliação de fitotoxicidade *in vivo* no tratamento em sementeira de cana-de-açúcar para o controle de fungos associados

Nome técnico	Produto comercial	Grupo químico	Classe	Formulação <sup>1</sup>	Concentração do i.a. (g/kg ou g/L)	Dose de i.a. (g/100L)		
						30% menor	Média (recomendada)	30% maior
Tiram	Rhodiauram	Dimetilditiocarbamato	protetor	SC	500	52,5	75	97,5
Carboxina + tiram	Vitavax-thiram 200 SC	Carboxanilida+ Dimetilditiocarbamato	sistêmico + protetor o	SC	200+200	84	120	156
Fludionoxil + metalaxil-M	Maxim XL	Fenilpirrol + Acilalaninato	protetor + sistêmico	SC	25+10	7,35	10,5	13,65
Mancozeb + metalaxil-M	Ridomil-Mancozeb	Dimetilditiocarbamato+ Acilalaninato	protetor + sistêmico	PM	640 + 80	151,2	216	280,8
Triadimenol	Baytan SC	Triazol	sistêmico	SC	150	31,5	45	58,5
Iprodiona	Rovral SC	Dicarboximida	protetor	SC	500	50	75	100

<sup>1</sup> PM= pó molhável.  
SC= suspensão concentrada.

As sementes foram distribuídas em bandejas brancas plásticas, de área 20 cm x 30 cm, de fundo furado para drenar o possível excesso de água no substrato. O substrato utilizado foi do tipo Plantmax®- estacas ornamentais da EUCATEX, estéril e foi irrigado antes da semeadura até se aproximar da “capacidade de campo”. Os fungicidas foram aplicados apenas uma vez, logo após a distribuição das sementes nas caixas, por meio de pulverizador de pressão acumulada de uso agrícola de 2 L de capacidade, com vazão de aproximadamente 150 mL/ min, pulverizando cerca de 67 mL/m<sup>2</sup>, em torno de 40 mL/bandeja. Sementes com aplicação apenas de água destilada foram utilizadas como controle.

Cada bandeja constou de uma repetição. Foram realizadas quatro repetições para cada dose dos fungicidas, portanto quatro bandejas por dose. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado.

As bandejas foram mantidas em casa de vegetação, sem irrigação durante as primeiras 24 h (para não lavar o produto aplicado na semente), variando a temperatura de 28 a 32°, com umidade relativa de aproximadamente 60%, por 10 dias, até a avaliação.

Primeiramente, um círculo de arame de 6,5 cm de diâmetro foi jogado aleatoriamente nas bandejas e, de dentro deste círculo, foram retiradas 30 plântulas. Foram observados os sintomas presentes, possíveis anomalias ou morte de plântulas, e foram medidas altura da parte aérea e comprimento de raiz com ajuda de uma régua. Posteriormente, o número de plântulas emergidas, de todas as bandejas, foi contado e somado às 30 plântulas inicialmente retiradas.

### **5.2.3 Validação do tratamento químico na sementeira**

Após obter os resultados da fungitoxicidade *in vitro*

Na avaliação foram analisados os aspectos: número de plântulas emergidas, porcentagem de plântulas com sintomas, possíveis anomalias ou morte de plântulas.

Os dados obtidos foram transformados em arco sen  $\sqrt{x / 100}$  e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### **5.3 Resultados e Discussão**

#### **5.3.1 Fungitoxicidade *in vitro***

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 17, Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.

Tabela 17 - Concentração (ppm) de fungicida necessária para inibir em 50% (ED<sub>50</sub>) o crescimento micelial de 17 isolados de fungos patogênicos à cana-de-açúcar

Fungicida	isolados									
	BSSC01	BSSC02	B01SC01	B01SC02	B02SC01	B02SC02	CL02SC02	PHHSC04	FSSC05	
Carbendazim + tiram	20,82	14,54	12,78	14,30	26,00	33,40	<1	14,51	8,28	
Mancozeb + metalaxil-M	7,64	5,77	17,29	11,57	20,47	6,32	11,45	53,09	>100	
Pencicuirom	31,10	5,97	>100	>100	97,86	17,5	>100	>100	>100	
Captana	20,38	8,05	12,27	4,37	94,28	19,97	26,59	61,66	>100	
Tolifluanida	3,86	<1	7,67	1,95	29,96	1,51	9,70	81,38	21,27	
Carboxina + tiram	5,10	1,51	10,57	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51	
Triadimenol	<1	<1	1,90	1,34	2,23	<1	18,82	12,82	2,16	
Iprodiona	<1	<1	44,34	<1	<1	<1	9,27	>100	>100	
Fludionoxil + metalaxil-M	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	

Fungicida	Isolados								
	FVSC08	FVSC09	CV01SC01	CV01SC02	CV02SC01	CV02SC03	CV03SC02	CV03SC03	
Carbendazim + tiram	5,62	6,69	23,33	15,71	54,85	22,24	38,90	15,96	
Mancozeb + metalaxil-M	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	
Pencicuirom	5,09	7,83	64,28	69,14	>100	>100	>100	>100	
Captana	56,23	84,53	63,84	44,85	>100	>100	>100	85,57	
Tolifluanida	24,47	24,97	51,47	24,17	>100	90,21	>100	51,18	
Carboxina + tiram	1,51	1,51	8,44	1,51	1,51	9,97	19,12	1,51	
Triadimenol	<1	<1	4,45	3,57	6,55	4,10	60,59	4,61	
Iprodiona	>100	>100	<1	<1	5,32	<1	<1	1,08	
Fludionoxil + metalaxil-M	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).



Figura 8 – Efeito de triadimenol, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

1- BSSC01	7- CL02SC02	13- CV01SC02
2- BSSC02	8- PHHSC04	14- CV02SC01
3- B01SC01	9- FSSC05	15- CV02SC03
4- B01SC02	10- FVSC08	16- CV03SC02
5- B02SC01	11- FVSC09	17- CV03SC03
6- B02SC02	12- CV01SC01	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).

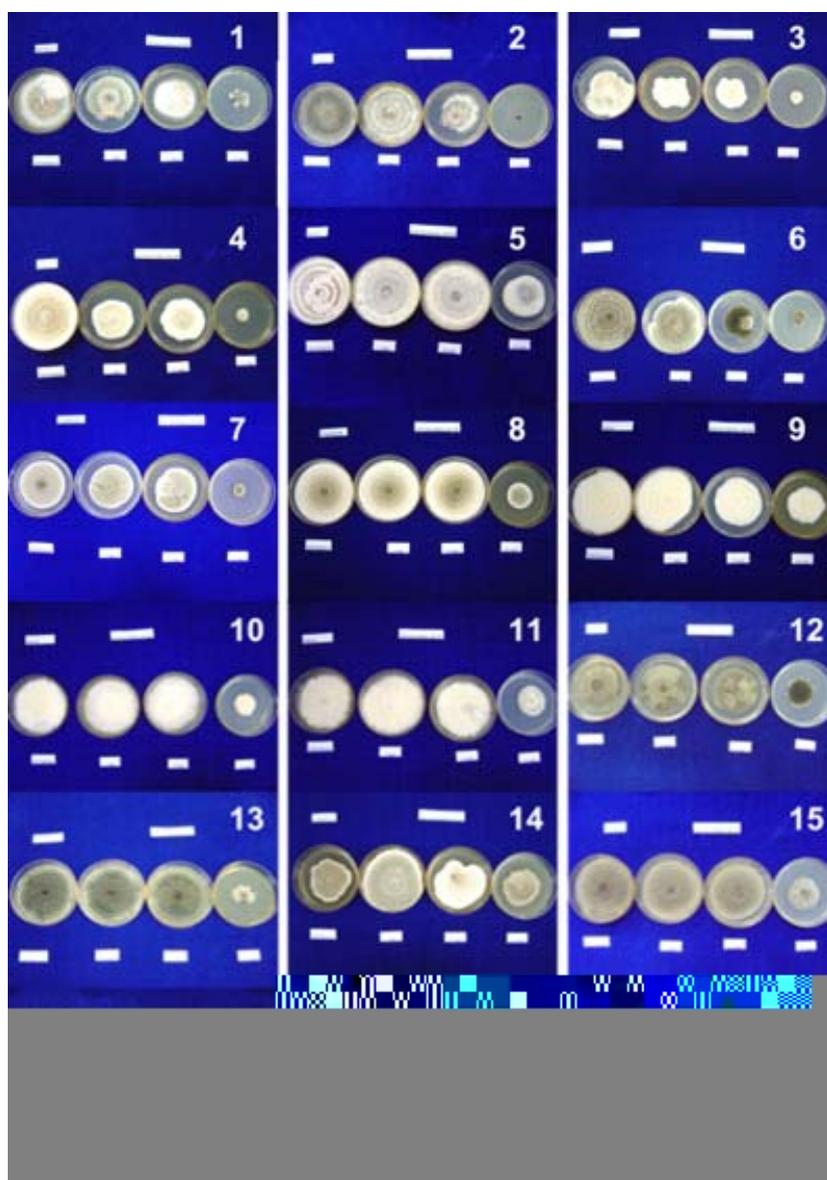


Figura 9 - Efeito de captana, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

1- BSSC01	7- CL02SC02	13- CV01SC02
2- BSSC02	8- PHHSC04	14- CV02SC01
3- B01SC01	9- FSSC05	15- CV02SC03
4- B01SC02	10- FVSC08	16- CV03SC02
5- B02SC01	11- FVSC09	17- CV03SC03
6- B02SC02	12- CV01SC01	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).

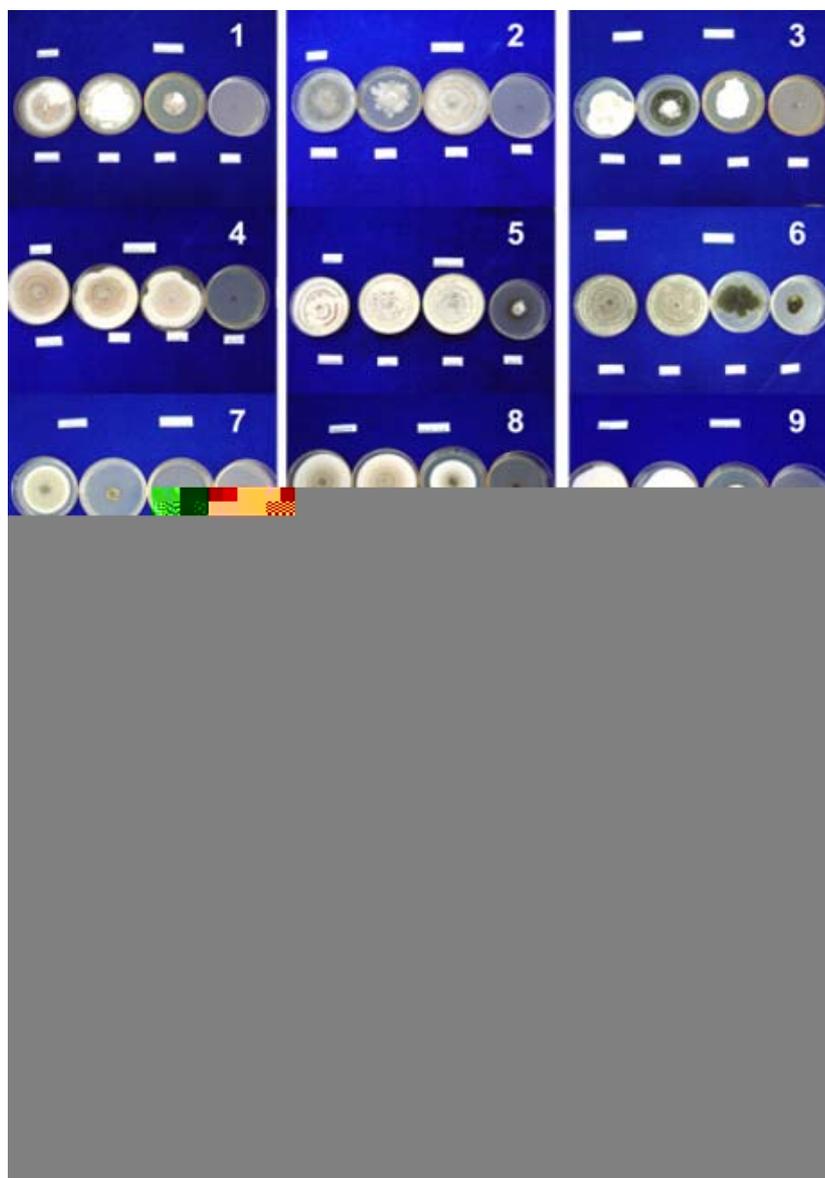


Figura 10 - Efeito de carbendazim + tiram, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

1- BSSC01	7- CL02SC02	13- CV01SC02
2- BSSC02	8- PHHSC04	14- CV02SC01
3- B01SC01	9- FSSC05	15- CV02SC03
4- B01SC02	10- FVSC08	16- CV03SC02
5- B02SC01	11- FVSC09	17- CV03SC03
6- B02SC02	12- CV01SC01	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).



Figura 11 - Efeito de tolifluanida, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

1- BSSC01	7- CL02SC02	13- CV01SC02
2- BSSC02	8- PHHSC04	14- CV02SC01
3- B01SC01	9- FSSC05	15- CV02SC03
4- B01SC02	10- FVSC08	16- CV03SC02
5- B02SC01	11- FVSC09	17- CV03SC03
6- B02SC02	12- CV01SC01	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).

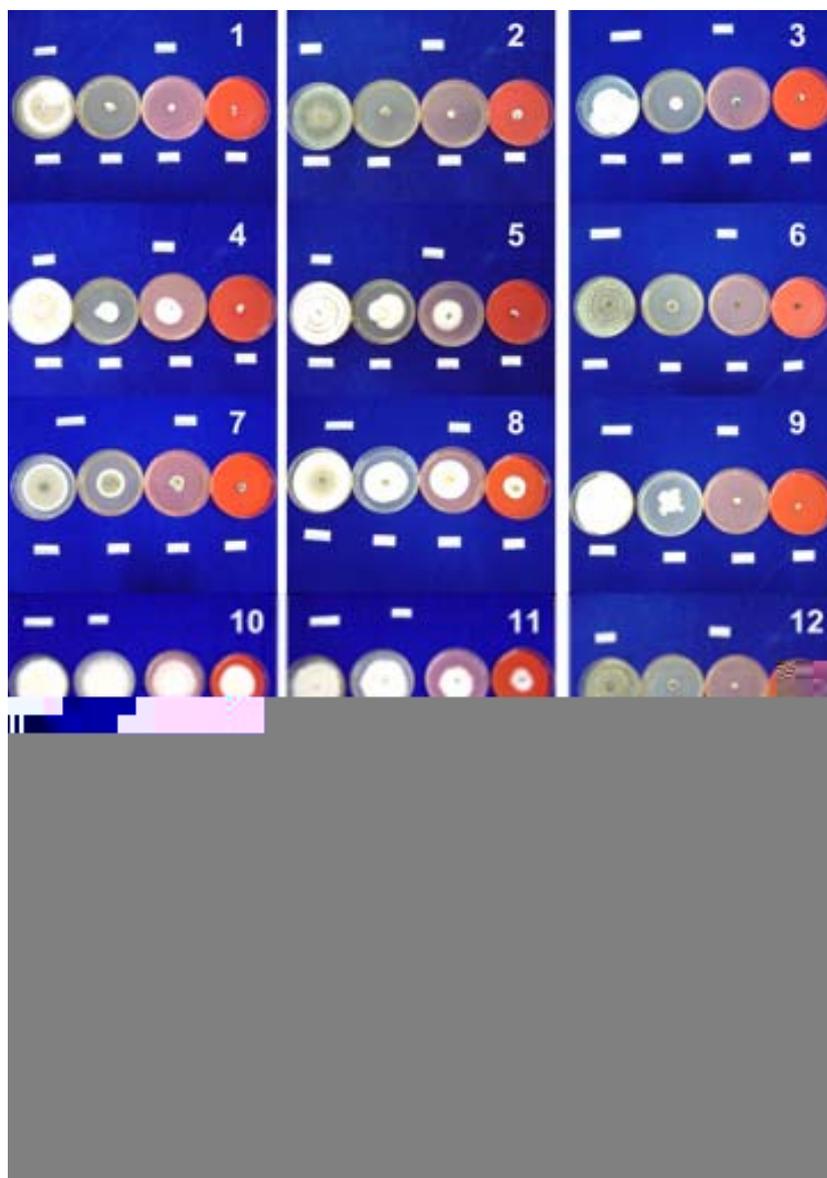


Figura 12 - Efeito de fludioxonil + metalaxil- M, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

1- BSSC01	7- CL02SC02	13- CV01SC02
2- BSSC02	8- PHHSC04	14- CV02SC01
3- B01SC01	9- FSSC05	15- CV02SC03
4- B01SC02	10- FVSC08	16- CV03SC02
5- B02SC01	11- FVSC09	17- CV03SC03
6- B02SC02	12- CV01SC01	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).

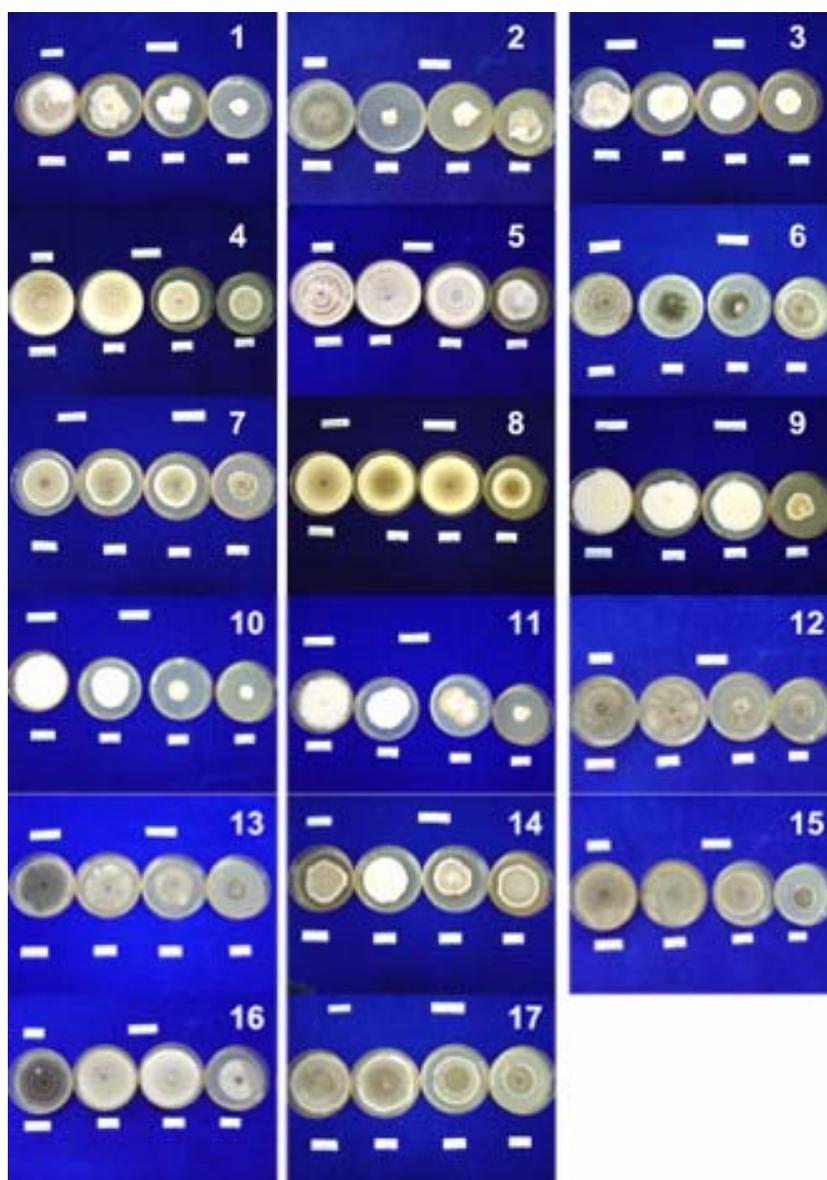


Figura 13 - Efeito de pencicrom, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

- |            |              |              |
|------------|--------------|--------------|
| 1- BSSC01  | 7- CL02SC02  | 13- CV01SC02 |
| 2- BSSC02  | 8- PHHSC04   | 14- CV02SC01 |
| 3- B01SC01 | 9- FSSC05    | 15- CV02SC03 |
| 4- B01SC02 | 10- FVSC08   | 16- CV03SC02 |
| 5- B02SC01 | 11- FVSC09   | 17- CV03SC03 |
| 6- B02SC02 | 12- CV01SC01 |              |

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).

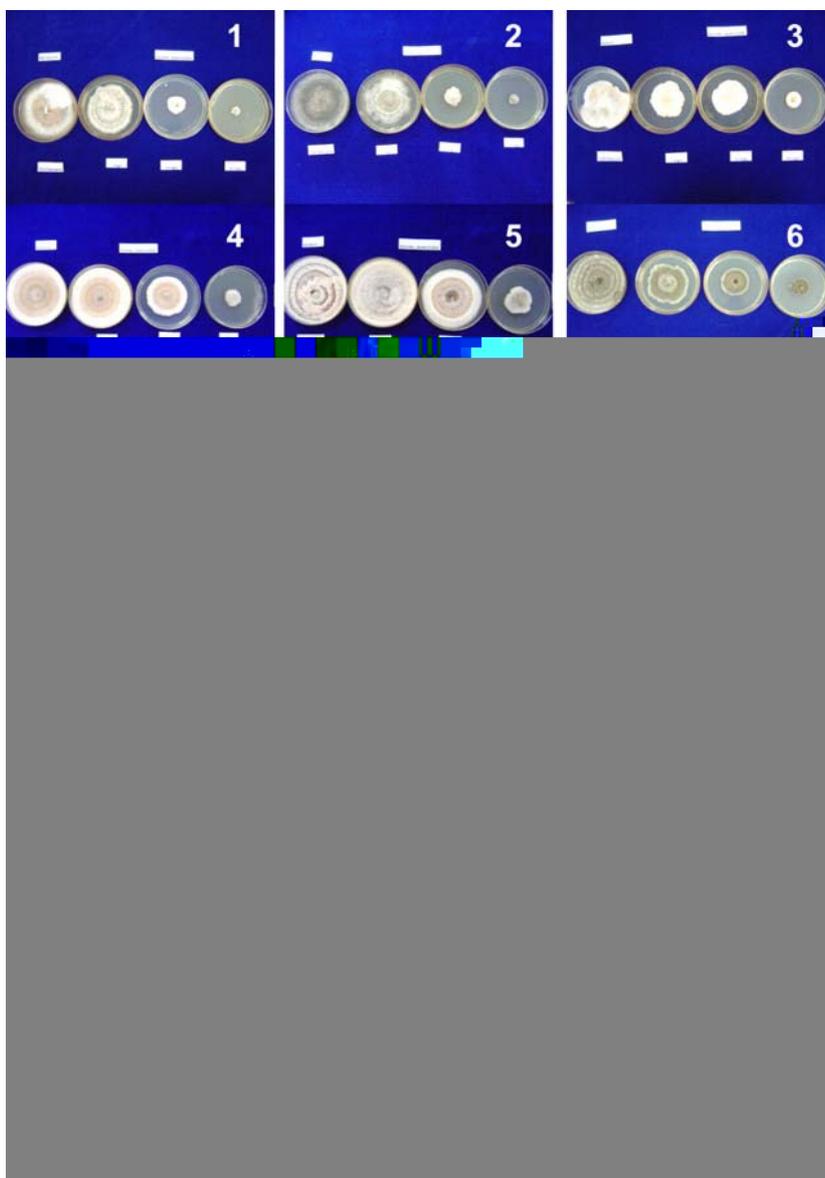


Figura 14 - Efeito de mancozeb + metalaxil- M, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

1- BSSC01	7- CL02SC02	13- CV01SC02
2- BSSC02	8- PHHSC04	14- CV02SC01
3- B01SC01	9- FSSC05	15- CV02SC03
4- B01SC02	10- FVSC08	16- CV03SC02
5- B02SC01	11- FVSC09	17- CV03SC03
6- B02SC02	12- CV01SC01	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).

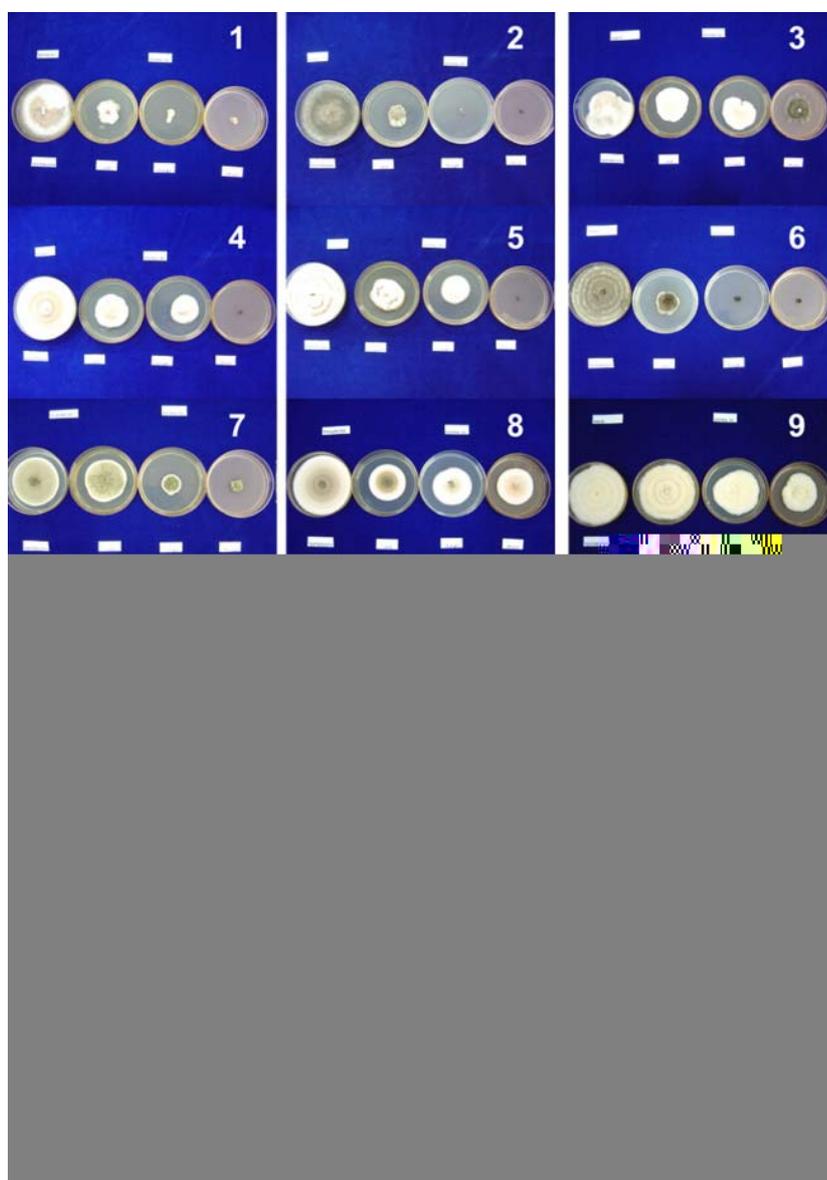


Figura 15 - Efeito de iprodiona, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

1- BSSC01	7- CL02SC02	13- CV01SC02
2- BSSC02	8- PHHSC04	14- CV02SC01
3- B01SC01	9- FSSC05	15- CV02SC03
4- B01SC02	10- FVSC08	16- CV03SC02
5- B02SC01	11- FVSC09	17- CV03SC03
6- B02SC02	12- CV01SC01	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).



Figura 16 - Efeito de carboxina + tiram, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm, na inibição *in vitro* a 17 isolados de diferentes fungos isolados de sementes de cana-de-açúcar

1- BSSC01	7- CL02SC02	13- CV01SC02
2- BSSC02	8- PHHSC04	14- CV02SC01
3- B01SC01	9- FSSC05	15- CV02SC03
4- B01SC02	10- FVSC08	16- CV03SC02
5- B02SC01	11- FVSC09	17- CV03SC03
6- B02SC02	12- CV01SC01	

nota: isolados de: *Bipolaris sacchari* (BSSC01, BSSC02); *Bipolaris* spp. (B01SC01; B01SC02; B02SC01; B02SC02); *Cladosporium* GM2 (CL02SC02); *Phoma* (PHHSC04); *Fusarium semitectum* (FSSC05); *Fusarium verticillioides* (FVSC08; FVSC09) e *Curvularia* spp. (CV01SC01; CV01SC02; CV02SC01; CV02SC03; CV03SC02; CV03SC03).

Todos os produtos comportaram-se diferentemente, de acordo com o isolado considerado.

De acordo com a Tabela 17, observa-se que carbendazim + tiram foi altamente eficiente apenas na inibição do isolado CL02SC02 e moderadamente eficiente na inibição de FSSC05, FVSC08 e FVSC09, todos fungos de conídios hialinos. Mancozeb + metalaxil-M não foi altamente eficiente na inibição de nenhum dos isolados avaliados e foi moderadamente eficiente apenas na inibição dos isolados BSSC01, BSSC02 e B01SC02. O produto pencicuron não foi altamente eficiente na inibição de nenhum dos isolados avaliados, e foi medianamente eficiente apenas para os isolados BSSC02, FVSC08 e FVSC09. Captana não foi altamente eficiente na inibição de nenhum dos isolados, apenas medianamente eficiente na inibição dos isolados BSSC02 e B01SC02.

Tolilfluanida não foi eficiente a nenhum dos isolados avaliados, mas foi medianamente eficiente a apenas BSSC01, B01SC01, B01SC02, B02SC02 e CL02SC02.

Carboxina + tiram não foi altamente eficiente a nenhum dos isolados avaliados, entretanto foi moderadamente eficiente a todos, com exceção de B01SC01 e CV03SC02, onde foi pouco eficiente.

Triadimenol foi altamente eficiente aos dois isolados de *Bipolaris sacchari* (BSSC01 e BSSC02), fungo patogênico mais freqüentemente encontrado, a B02SC02 e aos dois isolados de *Fusarium verticillioides*, FVSC08 e FVSC09. Para os demais isolados, este fungicida apresentou mediana eficiência, com exceção de CL02SC02, PHHSC04 e CV03SC02.

Iprodiona foi altamente eficiente à maioria dos isolados de *Bipolaris* e *Curvularia* (Dematiaceas) avaliadas, com exceção de B01SC01, sendo pouco eficiente. Ainda a respeito desses gêneros, para os isolados CV02SC01 e CV03SC03 foi moderadamente eficiente. Para o isolado CL02SC02 foi moderadamente eficiente e não foi eficiente na inibição do isolado PHHSC04 e a nenhum dos isolados do gênero *Fusarium*, FSSC05, FVSC08 e FVSC09.

Fludioxonil + metalaxil-M foi altamente eficiente na inibição de todos os isolados, sendo considerado o melhor entre todos os fungicidas avaliados. Entretanto, não se pode desprezar a ação do fungicida triadimenol, que nem sempre foi altamente ou medianamente eficiente a todos os isolados dos gêneros mais freqüentes, mas que foi

eficiente aos isolados das espécies ou dos grupos morfológicos de patógenos mais freqüentemente encontrados, por exemplo, para *Bipolaris sacchari*, *Fusarium verticillioides* e *Curvularia* GM 1.

Carbendazim + tiram, mancozeb + metalaxil-M, pencicuirom, captana, carboxina + tiram e iprodiona não devem ser recomendados para aplicação em sementeira de cana-de-açúcar para controle de patógenos, pois não são eficientes pelo menos aos grupos morfológicos ou espécies mais patogênicas.

Foram considerados os melhores fungicidas aqueles que apresentaram alta ( $ED_{50} < 1\text{ppm}$ ) ou moderada ( $ED_{50} 1-10\text{ ppm}$ ) eficiência na inibição da maioria dos isolados avaliados que, posteriormente, foram utilizados no teste de fitotoxicidade *in vivo*. Esses fungicidas foram fludioxonil + metalaxil-M e triadimenol

### **5.3.2 Fitotoxicidade de fungicidas a sementes / plântulas de cana-de-açúcar**

Neste estudo foram observados os possíveis efeitos prejudiciais sobre sementes e plântulas dos fungicidas que se destacaram pela melhor eficiência *in vitro*, por inibirem os principais fungos patogênicos às sementes e plântulas de cana-de-açúcar em condições de sementeira (Tabela 18).

Foram utilizados fludioxonil + metalaxil-M e triadimenol, por terem sido os fungicidas mais eficientes no controle dos fungos no teste *in vitro*. Também foram utilizados carboxina + tiram, tiram, iprodiona e mancozeb + metalaxil-M por terem sido relatados como eficientes no controle dos fungos, conforme trabalhos por outros autores (MACHADO, 2000; MENTEN et al., 2005).

Pela variável emergência notou-se que o fungicida triadimenol, na dose de 31,5g i.a./100L diminuiu a emergência de plântulas e que o mesmo fungicida, na dose 45 5g i.a./100L se diferenciou dos demais quando apresentou emergência significativamente superior. Esse fungicida poderia ser utilizado na menor dose avaliada (31,5 g), pois, quando nas maiores doses, causou diminuição da altura da parte aérea e comprimento de raiz, mesmo na concentração de 45g de i.a./100L, quando houve aumento na porcentagem de emergência de plântulas. Os demais fungicidas não diferenciaram estatisticamente da testemunha.

Fludioxonil e carboxina + tiram não foram considerados fitotóxicos por meio dos parâmetros avaliados.

Dentre as plântulas emergidas houve poucos casos de sintomas de fitotoxicidade na parte aérea, no colo ou na raiz, permitindo inferir que nenhum dos fungicidas, nas doses comparadas, apresentou significativa toxicidade às sementes e/ ou plântulas de cana-de-açúcar.

Nos parâmetros altura da parte aérea e comprimento de raiz os fungicidas que apresentaram fitotoxicidade, pois diferenciaram estatisticamente da testemunha, foram tiram, iprodiona e mancozeb + metalaxil-M.

Através da interpretação dos dados obtidos nas análises *in vitro* e *in vivo*, sugeriu-se que o melhor fungicida para aplicação em sementeira de cana-de-açúcar foi fludioxonil + metalaxil-M por ser eficiente na inibição dos fungos e não fitotóxico às sementes e plântulas.

Tabela 18 – Efeito do tratamento químico de diferentes fungicidas e doses sobre a emergência de plântulas, altura da parte aérea, comprimento de raiz e tipos de sintomas de fitotoxicidade (continua)

Fungicida	Dose i.a. (g/100L)	Emergência (%)	total de plântulas com sintomas de fitotoxicidade (%)*	Altura parte aérea (cm)	Comprimento raiz (cm)	Tipos de sintomas (%) **		
						parte aérea	colo	raiz
						fraco	rachadura	necrose
Testemunha		100ab*	0,63	0,78abcd	1abcde	0,42	0,21	0
Fludioxonil + metalaxil- M	7,35	85ab	0,26	1,03a	1,73a	0,26	0	0
Fludioxonil + metalaxil- M	10,5	95ab	0,13	1,06a	1,58abc	0	0,13	0
Fludioxonil + metalaxil- M	13,65	107ab	0	1,01ab	1,72a	0	0	0
Carboxina + tiram	84	100ab	0,29	0,96ab	1,11abcde	0,10	0,20	0
Carboxina + tiram	120	100ab	0	0,99ab	1,6ab	0	0	0
Carboxina + tiram	156	106ab	0,21	0,86abc	1,11abcde	0,10	0,10	0
Triadimenol	31,5	98ab	0,12	0,8abcd	1,24abcde	0,12	0	0
Triadimenol	45	112a	0	0,67cd	0,95bcde	0	0	0
Triadimenol	58,5	84b	0,11	0,78abcd	1,28abcde	0,11	0	0
Thiram	52,5	93ab	0,10	0,91d	0,91cde	0	0,10	0
Thiram	75	91ab	0	0,84d	0,84de	0	0	0
Thiram	97,5	95ab	0,11	0,87cd	0,87cde	0	0	0,11

Tabela 18 - Efeito do tratamento químico de diferentes fungicidas e doses sobre a emergência de plântulas, altura da parte aérea, comprimento de raiz e tipos de sintomas de fitotoxicidade

								(conclusão)
Iprodiona	50	109ab	0	1,07bcd	1,07abcde	0	0	0
Iprodiona	75	105ab	0	0,82cd	0,82de	0	0	0
Iprodiona	100	102ab	0	0,68cd	0,68de	0	0	0
Mancozeb + metalaxil- M	151,2	107ab	0,62	0,77bcd	0,77de	0,11	0,20	0,31
Mancozeb + metalaxil- M	216	106ab	0,81	0,69cd	0,67de	0,07	0,40	0
Mancozeb + metalaxil- M	280,8	93ab	0,31	0,63d	0,6e	0,20	0	0,11
CV (%)	-	11	-	9,6	13,1	-	-	-

\* Médias seguidas por letras iguais nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Excluídos da análise de variância

### 5.3.3 Validação do tratamento químico na sementeira

Os resultados encontrados na validação do experimento estão na Tabela 19.

Os fungos encontrados na análise sanitária, realizada previamente com as sementes da amostra, foram: *Cladosporium* GM1 (15,6%); *Fusarium verticillioides* (10,4%); *Fusarium semitectum* (1,2%); *Bipolaris sacchari* (7,2%); *Bipolaris* GM1 (0,4%); *Curvularia* GM1 (5,2%); *Curvularia* GM2 (0,4%); e *Phoma herbarum* (28,4%).

Não foi encontrada diferença significativa entre os resultados dos tratamentos e da testemunha pelos parâmetros emergência, porcentagem de plântulas sem sintomas e com sintomas.

Percebeu-se que existiu tendência coerente de aumento da porcentagem de emergência conforme aumento da dose do fungicida. Provavelmente, o fato de não ter dado resultado significativo se deva às incidências fúngicas naturais da amostra, que não foram expressivas. Trabalhos futuros poderiam ser realizados verificando a ação do tratamento fungicida em amostras de sementes de cana-de-açúcar com diversas incidências fúngicas e diferentes doses do fungicida. Essas doses poderiam ser aquelas avaliadas neste trabalho, não fitotóxicas, e doses maiores, para aumentar a probabilidade da eficiência do tratamento.

Tabela 19 – Resultados da validação do experimento de controle químico de patógenos associados às sementes de cana-de-açúcar.

Fungicida	Dose i.a. (g/100L)	Emergência (%)	Plântulas (%)		Tipos de sintomas (%)**			
			Sem sintomas	Com sintomas	Parte aérea	Colo		Raiz
					Severo	Rachadura	Necrose	Necrose
Testemunha		100a*	93a	7a	1,12	6,25	0,84	0,28
Fludionoxil + metalaxil- M	7,35	108,6a	88a	12a	2,08	4,14	0,76	0,00
Fludionoxil + metalaxil- M	10,5	116,02a	94a	6a	1,72	3,03	0,78	0,00
Fludionoxil + metalaxil-M	13,65	121,88a	93a	7a	2,20	1,95	0,42	0,42
CV (%)	-	9,65	2,34	26,20	-	-	-	-

\* Médias seguidas por letras iguais nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Excluídos da análise de variância

## 5.4 Conclusões

Os dados deste estudo mostraram que para o controle dos fungos avaliados, o fungicida fludioxonil + metalaxil-M foi o único altamente eficiente a todos os fungos avaliados. Triadimenol variou de altamente eficiente a medianamente eficiente no controle da maioria desses fungos. Esses dois fungicidas possivelmente terão sucesso quando pulverizados com o objetivo de controlar os fungos em sementeira de cana-de-açúcar, quando aplicados em doses apropriadas, isto é, fungitóxica e não fitotóxica.

Além da eficiência na fungitoxicidade *in vitro*, na avaliação *in vivo*, fludioxonil + metalaxil-M nas doses de 7,35;10,5 e 13,65 g/100L; seguido de triadimenol na dose de 31,5 g/100L não causaram fitotoxicidade às sementes e plântulas, das quais, essas doses constituem as recomendadas, neste estudo, para aplicação.

## Referências

BOLLEN, G.J.; FUCKS, A. On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 76, p. 299-313, 1970.

BRESSIANI, J.A. **Seleção seqüencial em cana-de-açúcar**. 2001. 134 p. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2001, Piracicaba, 2001.

BYTHER, R.S.; STEINER, G.W. Four sugarcane seedling diseases in Hawaii: causal agents, control, and a selective medium for isolation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 120-124, 1972.

EDGINGTON, L.V.; KHEN, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

FIGUEIREDO, P. et al. Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). In: FAHL, J.I. et al. (Ed.). **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 6.ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p. 251-253. (IAC. Boletim, 200).

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana. In \_\_\_\_\_. **Agriannual 2004: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2004. p. 213-231.

FRARE, V.C. **Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *citri* em sementes de melão (*Cucumis melo* L.)**. 2005. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

KATARIA, H.R.; GROVER, R.K. Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping-off of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 88, p. 257-263, 1978.

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

MENTEN, J.O.M.; LIMA, L.C.S.F.; FRARE, V.C.; RABALHO, A.A. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 2005. p. 333-374.

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

NARENDRA, D.V.; SETTY, M.V.N. Seed mycoflora of sugarcane and their importance in nurseries. **Seed Research**, New Delhi, v. 7, n. 2, p. 145-150, 1979.

MONDAL, S.N.; BHATIA, A.; SHILTS, T.; TIMMER, L.W. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 11, p. 1186-1194, 2005.

SANGUINO, A. **Patologia e controle dos fungos de sementes de cana-de-açúcar e resistência de progênies à *Helminthosporium sacchari***. 1976. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

SILVA, M.A.; CAMPANA, M.P.; LANDELL, M.G.; ZIMBACH, L.; FIGUEIREDO, P. Avaliação de clones de híbridos IAC de cana-de-açúcar, série 1985, na região de Jaú (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 335-340, 1999.

SOAVE, J.; MORAES, S.A. Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.V.S. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. cap. 8, p. 192-260.

## 6 CONCLUSÕES FINAIS

O método considerado mais adequado para a detecção de fungos associados às sementes de cana-de-açúcar foi placa de Petri de plástico, substrato papel de filtro e incubação por sete dias sob regime de luz alternada (12h luz branca fluorescente/ 12h escuro) e temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Tal método foi o mais econômico, sensível e prático.

Os gêneros fúngicos considerados mais importantes para sementes de cana-de-açúcar foram *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Phoma*, por serem os mais freqüentes e os que apresentaram maiores incidências. Sobre esses fungos, portanto, deve recair a demonstração de patogenicidade e provável foco dos tratamentos químicos e busca de fungicidas para o controle.

Não há relação de temperatura e umidade relativa do local de produção de sementes com incidência fúngica. Supõe-se que as variações possam estar relacionadas com diferentes fontes de inóculo nos locais de cruzamento ou características genéticas das sementes.

A partir da análise sanitária e de germinação de sementes de cana-de-açúcar, concluiu-se que *Bipolaris sacchari* e *Curvularia* GM1, associados às sementes, podem ser responsáveis pela não germinação, além de poderem causar sintomas nas plântulas (necróticos na parte aérea e na raiz).

Dentre os gêneros fúngicos mais freqüentes, os de maior patogenicidade foram *Curvularia* e *Bipolaris*, causadores de sintomas fracos a severos na parte aérea, rachadura e necrose no colo e necrose de raiz. Esses fungos, quando associados às sementes de cana-de-açúcar, podem causar sérios prejuízos no desenvolvimento de programas de melhoramento genético.

*Cladosporium* GM2, *Fusarium verticillioides* e um dos isolados de *Fusarium semitectum* e outro de *Phoma herbarum* foram considerados medianamente patogênicos, enquanto *Cladosporium* GM2 e um dos isolados de *Phoma herbarum* foram considerados pouco patogênicos/ não patogênicos.

A partir dessas constatações é possível concluir que o tratamento químico em sementeiras deve se dirigir à inibição desses fungos mais ou medianamente patogênicos.

Os dados deste estudo mostraram que para o controle dos fungos avaliados, o fungicida fludioxonil + metalaxil-M foi o único altamente eficiente a todos os fungos avaliados. Triadimenol variou de altamente eficiente a medianamente eficiente no controle da maioria desses fungos. Esses dois fungicidas possivelmente terão sucesso quando pulverizados com o objetivo de controlar os fungos em sementeira de cana-de-açúcar, quando aplicados em doses apropriadas, isto é, fungitóxica e não fitotóxica.

Além da eficiência na fungitoxicidade *in vitro*, na avaliação *in vivo*, fludioxonil + metalaxil-M, nas doses de 7,35;10,5 e 13,65 g/100L, seguido de triadimenol, na dose de 31,5 g/100L, não causaram fitotoxicidade às sementes e plântulas; essas doses constituem as recomendadas, neste estudo, para aplicação em sementeiras, visando maior produção de plântulas.

Quando foi realizado o tratamento químico das sementes naturalmente infectadas/ contaminadas para validação do melhor fungicida, as incidências foram consideradas baixas. Em prosseguimento a este estudo, portanto, há necessidade de se verificar o efeito desses fungicidas sobre sementes com alta incidência natural de fungos.

Além disso, outras doses de fungicida também poderiam ser comparadas, isto é, aquelas avaliadas neste trabalho, não fitotóxicas, e doses maiores, para aumentar a probabilidade da eficiência do tratamento.

Adicionalmente, ainda sobre os fungicidas, seria interessante, em futuros estudos, o exame da eficiência de outros ingredientes ativos não contemplados neste trabalho. Nesta pesquisa encontrou-se apenas um ingrediente ativo fungitóxico a todos os fungos mais freqüentemente detectados e não fitotóxico em nenhuma das doses avaliadas.

Esse controle químico, por meio de fungicidas, é uma das direções de futuras pesquisas. Outras importantes modalidades de controle que poderiam ser avaliadas no controle dos fungos patogênicos encontrados neste estudo referem-se aos controles físico e biológico.

Outro aspecto a ser contemplado refere-se ao fato deste estudo ter avaliado a patogenicidade dos fungos mais freqüentemente encontrados associados às sementes de cana-de-açúcar. Outras pesquisas poderiam ampliar os resultados obtidos, avaliando os fungos de menor ocorrência.

Seria também importante, em seqüência a este estudo, analisar o efeito de fungos de solo, como por exemplo *Pythium*, na emergência de plântulas e sintomas. Esses fungos podem estar presentes na água de irrigação não tratada e em solo ou substrato que não esteja esterilizado. Durante o desenvolvimento desta pesquisa empregou-se substrato comercial esterilizado e água tratada na irrigação.

## REFERÊNCIAS

- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th. ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1998. 218 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA; DNDV; CLAV, 1992. 206 p.
- BRESSIANI, J.A. **Seleção seqüencial em cana-de-açúcar**. 2001. 134 p. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2001, Piracicaba, 2001.
- BOLLEN, G.J.; FUCKS, A. On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 76, p. 299-313, 1970.
- BOOTH, C. **The genus fusarium**. Kew: CAB, 1971. 237 p.
- BYTHER, R.S.; STEINER, G.W. Four sugarcane seedling diseases in Hawaii: causal agents, control, and a selective medium for isolation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 120-124, 1972.
- CHIDAMBARAM, P.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. **Identification of seed-borne Drechslera species**. Copenhagen: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1973. 207 p.
- EDGERTON, C.W. **Sugarcane and its diseases**. Baton Rouge: Louisiana State University Press, 1955. 291 p.
- EDGINGTON, L.V.; KHEN, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>>. Acesso em: 4 ago. 2006.
- FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 73-82, jan./dez. 2001.
- FIGUEIREDO, P. et al. Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). In: FAHL, J.I. et al. (Ed.). **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 6.ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p. 251-253. (IAC. Boletim, 200).
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana. In \_\_\_\_\_. **Agrianual 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2004. p. 213-231.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana. In \_\_\_\_\_. **Agrianual 2006**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p. 227-248.

FRARE, V.C. **Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *citruli* em sementes de melão (*Cucumis melo* L.)**. 2005. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

HANLIN, R.T. **Illustrated genera of ascomycetes**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1990. 263 p.

HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1987. 603 p.

KATARIA, H.R.; GROVER, R.K. Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping-off of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 88, p. 257-263, 1978.

LOVELESS, A.R.; SMITH, C.E.M. Seedling blight of sugar-cane: a new disease caused by *Helminthosporium sacchari* Butler. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 44, n. 4, p. 419-424, 1956.

LUCCA FILHO, O. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S., (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p. 430-440.

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

MATHUR, S.B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. Basserdorf: International Seed Testing Association, 2003. 425 p.

MENTEN, J.O.M.; LIMA, L.C.S.F.; FRARE, V.C.; RABALHO, A.A. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 2005. p. 333-374.

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

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991. 321 p.

MONDAL, S.N.; BHATIA, A.; SHILTS, T.; TIMMER, L.W. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 11, p. 1186-1194, 2005.

NARENDRA, D.V.; SETTY, M.V.N. Seed mycoflora of sugarcane and their importance in nurseries. *Seed Research*, New Delhi, v. 7, n. 2, p. 145-150, 1979.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2nd. ed. Copenhagen: Mc Millan, 1979. 1190 p.

PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M.; MARTINS, M.C. Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 25-30, 1999.

REGO, A.M. Análise sanitária na produção de sementes de hortaliças. In: ZAMBOLIM, L., (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; Departamento de Fitopatologia, 2005. p. 267-294.

SANGUINO, A. **Patologia e controle dos fungos de sementes de cana-de-açúcar e resistência de progênies à *Helminthosporium sacchari***. 1976. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

SILVA, M.A.; CAMPANA, M.P.; LANDELL, M.G.; ZIMBACH, L.; FIGUEIREDO, P. Avaliação de clones de híbridos IAC de cana-de-açúcar, série 1985, na região de Jaú (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 335-340, 1999.

SILVA, W.M. **Pré-seleção de "seedlings" de cana-de-açúcar resistentes a *Ustilago scitaminea*, pela inoculação da "sementes"**. 1978. 65 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978.

SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; MATHUR, S.B. **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins**. Lyngby: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1991. 133 p.

SINHA, O.K.; SINGH, K. Sugarcane seed decay: prevalence of fungi and collar rot of seedlings caused by *Curvularia* spp. and *Drechslera* spp. **Seed Research**, New Delhi, v. 10, n. 2, p. 114-119, 1982.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Micological papers**. Wallingford: CAB International Mycological Institute, 1987. 261 p.

SOAVE, J.; MORAES, S.A. Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.V.S. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. cap. 8, p. 192-260.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 17, n. 3/4, p. 218-231, 1991.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)