



**LUCAS MANSANO ARACRI**

**USO DE DIFERENTES MISTURAS DE RESTRITORES HÍDRICOS  
COMO ALTERNATIVA AO USO DO MANITOL NO PROCESSO DE  
INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODÃO, SOJA E MILHO**

**LAVRAS**

**2019**

**LUCAS MANSANO ARACRI**

**USO DE DIFERENTES MISTURAS DE RESTRITORES HÍDRICOS COMO  
ALTERNATIVA AO USO DO MANITOL NO PROCESSO DE INOCULAÇÃO DE  
SEMENTES DE ALGODÃO, SOJA E MILHO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

**Prof.Orientador:** José da Cruz Machado

**LAVRAS**

**2019**

## **Agradecimentos**

A Deus, por me proporcionar o cumprimento de mais uma etapa em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmicas durante minha graduação.

Ao meu orientador, Professor José da Cruz Machado, pelas diversas oportunidades e pelos ensinamentos transmitidos durante todo o meu estágio no Laboratório de Patologia de Sementes.

A todos os membros do Laboratório de Patologia de Sementes, por toda a amizade e aprendizado ao longo desses anos. À Carol e Luiza por aceitarem fazer parte da banca e principalmente a Iara por, além de fazer parte da banca, ter me ajudado na correção desse trabalho.

Aos meus pais José Fernando e Edna, à minha irmã Fernanda e a toda a minha família pelo amor e apoio recebido, pela motivação passada e por sempre acreditarem no meu sucesso.

A todos os meus amigos, em especial Brenner, Fred, Guilherme, Ítalo, Júlio César, Mauro Marcos Vinicius, Pedro Paulo, Pedro Teixeira, Renato, Tales, Tanaka e principalmente Rodrigo, por toda a amizade, companheirismo e momentos vividos ao longo desses 5 anos de minha graduação.

## Resumo

A disponibilidade de sementes infectadas com diferentes graus de contaminação se faz necessário nos estudos em patologia de sementes. A técnica de restrição hídrica, para a inoculação de sementes, vem mostrando-se eficaz para a obtenção de lotes de sementes com níveis de infecção desejado. Esta técnica de inoculação inibe a germinação das sementes e possibilita a colonização destas pelos fungos. Dentre as substâncias utilizadas como restritor hídrico o manitol é o mais utilizado, porém, este composto está na lista de produtos químicos controlados pela polícia federal, dificultando a compra e o uso em grande quantidade. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi a busca por alternativas ao uso do manitol que sejam viáveis economicamente e com mesma eficiência quando utilizada como restritor hídrico, em métodos de inoculação de sementes por fungos fitopatogênicos. Foram avaliados os efeitos da mistura do manitol e sacarose na inibição da germinação, no crescimento micelial e no teste de sanidade de sementes nos patossistemas *Fusarium verticillioides* em milho (*Zea mays*), *Colletotrichum truncatum* em soja (*Glycine max*) e *Rhizoctonia solani* em algodão (*Gossypium hirsutum*). Observou-se que a utilização de sacarose no pré-condicionamento de sementes, pura ou em mistura, pode ser um procedimento eficaz para obtenção de sementes infectadas por importantes fungos como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum truncatum*. Em substratos de cultivo fúngico contendo a sacarose pura ou em mistura, observou-se que o uso dos diferentes potenciais hídricos não prejudicou ou inibiu o crescimento micelial dos fungos em estudo.

**Palavras-chave:** Crescimento de fitopatógenos. Potencial Osmótico. Sacarose.

## Abstract

The availability of infected seeds with different degrees of contamination by fungi or other pathogens transmitted by this route is possible in studies on seed pathology. The water restriction technique for seed inoculation has proved to be effective in obtaining seed lots with the desired levels of infection. This inoculation technique is able to inhibit the germination of the seeds and allows the colonization of these by the fungi. Among the substances most used as water restriction, mannitol is the most used, however, this compound is on the list of chemicals controlled by the federal police, making it difficult to buy and use in large quantities. In this study was searched cheap alternatives to the use of mannitol and with has the same efficiency when used as a water restrictor, in methods of seed inoculation by phytopathogenic fungi. Were evaluated the effects of mixtures of mannitol + sucrose as a water restriction on germination, mycelial growth and seed health test in the patossystems of *Fusarium verticillioide* sin maize (*Zea mays*), *Colletotrichum truncatum* in soybean (*Glycine max*) and *Rhizoctonia solani* in cotton (*Gossypium hirsutum*).The studies have shown that the use of sucrose in the preconditioning of seeds, pure or in mixture, can be an effective procedure to obtain seeds infected by important fungi such as: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides* and *Colletotrichum truncatum*.In substrates of fungal culture containing the pure sucrose or in combination with the water potencies it was observed that the use of the different media did not impair or inhibit the mycelial growth of the fungi in study.

**Keywords:** Growth of phytopathogens. Osmotic potencial. Sucrose

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Informações sobre as sementes utilizadas no experimento.....	14
<b>Tabela 2:</b> Diferentes concentrações e misturas de restritores utilizados na pesquisa, -1,4 Mpa a 25°C.....	16
<b>Tabela 3:</b> Diferentes concentrações e misturas de restritores utilizados na pesquisa,-1,0 Mpa a 25°C.....	17
<b>Tabela 4:</b> Potencias hídricos de cada mistura descritas nas Tabelas 2 e 3 a 25°C.....	17

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Porcentagem de incidência de *Rhizoctonia solani* em sementes de algodão inoculadas em diferentes concentrações e misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (Ágar e Água).. ..... 19
- Figura 2:** Valores do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Rhizoctonia solani* em diferentes misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (BDA, Ágar e Água).. ..... 20
- Figura 3:** Porcentagem de incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho inoculadas em diferentes concentrações e misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (Ágar e Água).. ..... 21
- Figura 4:** Porcentagem de germinação de sementes de milho submetidas a diferentes concentrações e misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) .....23
- Figura 5:** Valores do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Fusarium verticillioides* em diferentes misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (BDA, Ágar e Água) .....24
- Figura 6:** Porcentagem de incidência de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja inoculadas em diferentes concentrações e misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (Ágar e Água) .....24
- Figura 7:** Valores do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Colletotrichum truncatum* em diferentes misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (BDA, Ágar e Água).....25

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
2.1 Aspectos gerais das culturas de algodão, milho e soja .....	10
2.2. Principais patógenos associados as sementes de algodão, milho e soja .....	11
2.3 Inoculação de sementes por através do condicionamento hídrico .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Obtenção de isolados fúngicos e das sementes utilizadas .....	14
3.2 Inoculação dos fungos pela técnica de condicionamento hídrico .....	14
3.3 Avaliação da inoculação de sementes, da germinação e do crescimento micelial dos fungos em estudo .....	15
3.4 Análise estatística .....	17
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
4.1. Respostas das sementes de algodão e do fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i> submetidos as diferentes concentrações e condicionadores .....	18
4.2. Respostas das sementes de milho e do fitopatógeno <i>Fusarium verticillioides</i> submetidos as diferentes concentrações e condicionadores .....	21
4.3 Respostas das sementes de soja e do fitopatógeno <i>Colletotrichum truncatum</i> submetidos as diferentes concentrações e condicionadores .....	23
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A sanidade é um aspecto importante na qualidade de sementes, visto que a maioria dos organismos, capazes de causar doenças em plantas, podem ser transmitidos pelas sementes de seus hospedeiros. Em estudos no âmbito da patologia de sementes a disponibilidade de sementes infectadas, em diferentes graus de contaminação, por fungos ou outros patógenos transmissíveis por esta via se faz necessário, pois, na prática, nem sempre é possível encontrar lotes de sementes com níveis de infecção desejados.

Para resolver este problema, a inoculação de sementes com os patógenos de interesse pode ser utilizada, pois possibilita a infecção e ocorrência de sintomas nestes tecidos. O método da restrição hídrica, desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras tem se mostrado muito eficiente em promover a infecção dos tecidos em diferentes níveis, sendo muito útil no desenvolvimento de pesquisas. Nesta metodologia, a protrusão da radícula é inibida pela adição de solutos que geram uma condição de deficiência hídrica que paralisa o processo de germinação das sementes.

O Manitol é um dos produtos mais utilizados para este fim. A obtenção deste composto, entretanto, é dificultada pelo fato de sua distribuição ser controlada pela polícia federal, além de possuir um alto custo. Deste modo, alternativas mais rentáveis, que promovam a redução do uso deste produto são investigadas. Devido esta dificuldade, o objetivo deste trabalho foi encontrar uma alternativa ao uso exclusivo do manitol que seja menos onerosa e que possa ter a mesma eficiência quando usado como restritor hídrico, em métodos de inoculação de sementes e análise de sanidade de sementes.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais das culturas de algodão, milho e soja

A cultura do algodão (*Gossypium hirsutum*) tem grande importância devido a sua utilização como fonte de óleo e proteínas, e principalmente a aplicação de sua pluma na indústria têxtil (USDA, 2017; 2018). Para a safra 2018/19 a estimativa da produção mundial foi de 25,9 milhões de toneladas, com uma queda de 3,9% no volume produzido. Em relação ao panorama nacional, estima-se uma produção para a safra 2018/19 de 2.663,8 mil toneladas de pluma, o que significaria um aumento de 32,8% em relação ao produzido na safra anterior, que foi de 2.005,8 mil toneladas. O aumento da produtividade, em relação à safra anterior, é estimado em 1,9% com um aumento de área esperada de 35,3%, atingindo 1.589,7 mil hectares (CONAB, 2019).

O milho (*Zea mays*) está entre os grãos mais cultivados pelo homem, é uma das culturas mais antigas e de grande relevância até os dias atuais. O principal uso dessa cultura é na alimentação animal e tem seu crescimento sempre relacionado com a produção animal. Para a safra 2018/2019, a estimativa de produção total de milho deverá atingir 95,2 milhões toneladas, representando um aumento de 18% em relação à temporada passada, que foi comprometida por problemas climáticos ocorridos na segunda safra. O forte aumento na área plantada e a expectativa positiva na produção deverão estabelecer novos recordes nacionais, contribuindo para que a produção, englobando a primeira e segunda safras, se transformando na segunda maior safra do cereal produzida no país (Companhia Nacional de Abastecimento, 2019).

Outra cultura que se destaca no Brasil, devido sua utilização na obtenção de óleo vegetal e na alimentação animal, é a soja (*Glycine Max* (L.) Merrill), sendo um dos produtos mais exportados pelo país. Segundo dados do CONAB (2019), a expectativa para a temporada 2018/19 manterá a tendência de crescimento de área plantada, atingindo 1,9% de crescimento em relação à safra passada, correspondendo ao plantio de 35.802 mil hectares. A soja é um produto com forte liquidez, que tem proporcionado um quadro de suporte dos preços no âmbito interno, reforçando a aposta anual dos produtores no incremento de área para esse produto. O produtor tem incrementado o uso de tecnologia a fim de aumentar a produtividade e, dessa forma, melhorar sua rentabilidade. Assim, a produtividade da soja saltou de 2.823 kg/ha na safra 2006/07, para 3.193 kg/ha na safra 2018/19, um salto de 13,1%.

## 2.2. Principais patógenos associados as sementes de algodão, milho e soja

Um dos conceitos que mais tem merecido atenção, nos sistemas produtivos e no comércio agrícola, é qualidade sanitária das sementes, considerando os reflexos negativos que a associação de patógenos com sementes pode acarretar, uma vez que, a semente é um insumo básico para a produção da maioria das espécies vegetais de interesse humanos (BARROCAS & MACHADO, 2010).

A cotonicultura se destaca no cenário agrícola mundial devido à utilização dos seus produtos e subprodutos. O algodoeiro é uma planta cultivada em pequenas e grandes propriedades, no Brasil, e em regiões com condições climáticas e ecológicas variadas. É a indústria têxtil o principal destino do produto, fibras de algodão, e como subprodutos, destacam-se o farelo e o óleo de algodão, ambos extraídos da semente (SILVA, 2012).

A cultura do algodoeiro esta suscetível à incidência de um elevado número de doenças, cujos patógenos são, em sua maioria, transportados e/ou transmitidos por sementes. Dentre as doenças que atacam o algodoeiro, o “tombamento” é considerado uma das principais devido à frequência com que ocorre e pelos danos que causa na fase inicial de estabelecimento da lavoura. Este é causado por um complexo de fungos de solo e de semente, os quais, ocorrendo separadamente ou em combinação, podem ocasionar o tombamento de pré e pós-emergência das plântulas. Um dos principais agentes etiológicos causadores do tombamento de plântulas de algodoeiro é o fungo da espécie *Rhizoctonia solani* (CHITARRA et al., 2008; MACHADO et al., 2004; GOULART, 2008).

Em relação as sementes de milho, dentre os vários fatores que afetam a sua qualidade, os microrganismos merecem destaque uma vez que, além de estarem associados à qualidade sanitária, podem afetar a germinação e o vigor, e também aceleram o processo de deterioração durante o armazenamento. Além disso, agentes etiológicos da maioria das doenças que afetam a cultura do milho podem ser disseminados e transmitidos por sementes contaminadas. No Brasil, as principais doenças relacionadas ao milho são causadas por fungos, sendo representado principalmente pelo gênero *Fusarium*, mais comumente a espécie *Fusarium verticillioides* que além de atacar as raízes e colmo da planta, são os grandes causadores de grãos ardidos que danificam a produção e muitas vezes são identificados apenas nos centros de processamentos (FANTAZZINI et al., 2016).

Esta associação, na maioria dos casos, reduz a qualidade fisiológica das sementes, favorecendo também a dispersão de patógenos por longas distâncias e transmissão de patógenos da semente à planta (COUTINHO et al., 2007).

A cultura da soja é uma das principais *commodities* agrícolas com alta relevância na economia global (ROGERIO et al., 2016). A maior parte das doenças que acarretam perdas econômicas ocorre na cultura da soja, merecendo destaque o fungo *Colletotrichum truncatum*, causador da antracnose da soja (GOULART, 2009).

Os principais sintomas aparecem através de pontuações escuras nas vagens, hastes e pecíolos foliares que depois evoluem para pontuações necróticas. Porém o principal dano é causado na fase reprodutivo devido a torção e abortamento de vagens, levando a grande queda de produtividade. As sementes infectadas e resíduos de culturas podem ser fontes de inóculo da doenças (ROGÉRIO et al., 2016).

### **2.3 Inoculação de sementes por através do condicionamento hídrico**

Lotes de sementes com níveis homogêneos de infecção são importantes para estudos dentro da área de Patologia de Sementes como eficácia do tratamento de sementes, estudos de transmissão de patógenos via semente, métodos de detecção de fitopatógenos, além de outros (MACHADO, 2000; CARVALHO, 1999). Porém esses níveis de infecção nem sempre são encontrados.

A técnica de restrição hídrica, em substratos utilizados para inocular fungos em sementes, tem sido eficaz no controle (inibição) da germinação das sementes sem afetar o desenvolvimento dos fungos já testados (AMARAL et al., 1996; CARVALHO, 1999 e MACHADO et al., 2007). As sementes são colocadas em contato direto com o fungo desenvolvido em um meio de cultura apropriado, modificado osmoticamente pela adição de um soluto iônico ou não iônico, em um nível de restrição hídrica que não interfira no crescimento micelial, mas que seja suficiente para retardar a germinação das sementes por um período de tempo necessário para que ocorra o processo de infecção (COUTINHO et al., 2001).

Na técnica de restrição há o uso de solutos como, polietileno glicol (PEG), manitol, KCl, NaCl, NaOH, MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glicerol ou sacarose a substratos agarizados que permitem a embebição das sementes sem que ocorra a protrusão da radícula. Dessa forma é possível expor sementes a substratos, reproduzindo condições de deficiência hídrica, e contendo, ao mesmo tempo, colônias fúngicas que infectam as sementes em função do tempo de contato entre sementes e patógeno (BARROCAS et al., 2014).

Dentre esses solutos, um dos mais utilizados é o manitol devido a sua grande

eficiência quando empregado como restritor hídrico principalmente nos potenciais de -1,0MPa e -1,2MPa, não promovendo a germinação nos teste de incubação e não interferindo no desenvolvimento e detecção de diversos fitopatógenos (MACHADO,2007). O manitol é um poliálcool constituído por seis carbonos de fórmula química  $C_6H_{14}O_6$ . Tem como características ser adocicado, inodoro e altamente solúvel em água e álcool em temperaturas mais altas.

O manitol tem sua venda regulado pela polícia federal por se enquadrar na lista III de produtos sujeitos a fiscalização (Fármacos, adulterantes e diluentes capazes de serem empregados na preparação de drogas, sujeitos a controle e fiscalização a partir de 1 (um) grama ou 1 (um) mililitro, em qualquer concentração). Sua aquisição só é liberada a partir do preenchimento de um laudo que comprove o uso do solvente para pesquisa científica, sendo assim isento de fiscalização (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO,PORTARIA Nº 240, DE 12 DE MARÇO DE 2019). É por isso que o uso de outros restritores se faz necessário, devido a restrição e a dificuldade de compra do manitol.

A sacarose é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose unidas entre si, com fórmula  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Tem como características ser um cristal branco, doce e altamente solúvel em água a temperatura ambiente. Apesar de haver trabalhos que comprovem a eficiência da sacarose como restritor hídrico (COSTA et al., 2003), há necessidade de se evidenciar o uso da sacarose de uma forma mais geral, analisando suas interações com o maior número de patógenos possíveis. Se comparada com o manitol, a aquisição de sacarose é muito simples e acessível, além de ser um soluto menos oneroso.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras - MG. Para o desenvolvimento deste estudo foram escolhidos três patossistemas: *Fusarium verticillioides* em milho (*Zea mays*), *Colletotrichum truncatum* em soja (*Glycine max*) e *Rhizoctonia solani* em algodão (*Gossypium hirsutum*), considerando-se a relevância fitossanitária das doenças causadas por estes fungos no Brasil.

#### 3.1 Obtenção de isolados fúngicos e das sementes utilizadas

Os isolados de *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum truncatum* e *Rhizoctonia solani* foram obtidos da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes/Departamento de Fitopatologia da UFLA, sendo estes coletados a partir de amostras de sementes de milho, soja e algodão provenientes de ensaios anteriores. As sementes de milho utilizadas foram da cultivar 30F53VYH da empresa Dupont Pioneer®, oriundas da safra de 2017/2018, as de soja foi a cultivar M6410 da Monsanto®, as de algodão foi a cultivar TMG11WS. Através das Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009), foram obtidos os perfis dessas sementes.

**Tabela 1:** Informações sobre as sementes utilizadas no experimento

Cultura	Cultivar	% Germinação
Algodão	TMG11WS	87%
Milho	30F53VYH	90%
Soja	M6410	92%

#### 3.2 Inoculação dos fungos pela técnica de condicionamento hídrico

As sementes foram contaminadas com os isolados fúngicos por meio da metodologia descrita por Costa et al. (2003), denominada de condicionamento hídrico, na qual os fungos foram cultivados inicialmente em meio BDA a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  para a obtenção de colônias. Posteriormente, foram colocados sobre meio sólido BDA (Batata, Dextrose e Ágar) acrescido de manitol e ou sacarose, a -1,4 MPa para o milho (Tabela 2) e -1,0 MPa para soja e algodão

(Tabela 3), em placas de Petri de 15 cm. A testemunha foi inoculada em meio de BDA somente. As placas foram acondicionadas em um ambiente à 25°C e 12 horas de luz, durante 7 dias. Após esse período, 50 sementes foram colocadas em cada placa, variando-se os meios de acordo com os tratamentos, e posteriormente incubadas a uma temperatura de 25°C. As sementes permaneceram sobre a colônia fúngica durante 48 horas, onde depois foram retiradas desse meio e colocadas em bandejas para secagem a 25° por 48 horas.

### **3.3 Avaliação da inoculação de sementes, da germinação e do crescimento micelial dos fungos em estudo**

#### **3.3.1 Teste de Sanidade (Blotter Test)**

Para o teste de sanidade das sementes, utilizou-se placas de Petri de 15 cm contendo 3 folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com as soluções de água e ágar. As sementes previamente infectadas pelos patógenos em estudo de acordo com cada tratamento, foram distribuídas sobre o papel filtro, sendo 40 sementes por placa e 5 repetições para cada tratamento (BRASIL,2009). Essas placas contendo as sementes foram incubadas a 20°C, em um ambiente controlado com um fotoperíodo de 12h durante 7 dias. Em seguida, essas sementes foram analisadas individualmente com a ajuda de um microscópio estereoscópio para identificação dos fungos em estudo. Os resultados foram expressos em percentagem de incidência por tratamento para cada cultura em análise.

#### **3.3.2 Avaliação da germinação das sementes de milho, soja e algodão dispostas em meio cultura contendo condicionadores hídricos**

O teste da germinação foi realizado com sementes de milho, soja e algodão em placas de Petri de 15 cm contendo os meios descritos nas Tabelas 2 e 3, usando um potencial de -1,4 Mpa para Milho e -1,0 Mpa para Soja e Algodão. Cada tratamento possuía 5 repetições para cada cultura, onde foi realizada a contagem do número total de sementes que germinaram ao longo de 7 dias que foram colocadas nesses meios. Cada placa apresentava 120 sementes por cultura.

#### **3.3.3 Avaliação do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial dos fungos**

Para verificar a influência dos meios de cultura modificados (Tabela 2 e 3), nos fungos em estudo, utilizou-se placas de Petri de 9 cm contendo meio Batata Dextrose ágar acrescido de diferentes restritores (Tabela 2 e 3). A testemunha foi colocada em meio BDA sem

nenhum dos condicionadores hídricos. Discos de micélio dos fungos em estudos foram dispostos no centro da placa de Petri e acondicionados a 25 °C, fotoperíodo de 12 horas, por um período de 7 dias ou até o crescimento do fungo em toda a placa. Utilizou-se 5 repetições para cada tratamento, as medições foram realizadas todos os dias com ajuda de uma régua milimetrada. Como testemunha foi usado o meio BDA, comumente utilizado para o crescimento desses fungos. Após esse período, foi calculado o Índice de Velocidade Crescimento De Velocidade Micelial como descrito pela fórmula de Oliveira, 1991 sendo:

$$IVCM = \sum(D - Da)/N$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

Para o cálculo das quantidades de soluto em cada um dos tratamentos descritos na Tabela 2 e Tabela 3 nos diferentes níveis de potenciais hídrico, utilizou-se o software SPPM (Michel e Radcliffe, 1995).

**Tabela 2:** Concentrações e misturas de condicionadores hídricos utilizados na pesquisa, para-1,4 Mpa a 25°C.

<b>Tratamentos</b>	<b>Misturas</b>	<b>Dose para 1 litro de meio (g)</b>
Tratamento 1	100% Manitol	96,4g de Manitol
Tratamento 2	75% Manitol e 25% Sacarose	72,3g de Manitol e 41,45g de Sacarose
Tratamento 3	50% Manitol e 50% Sacarose	48,2 g de Manitol e 82,9g de Sacarose
Tratamento 4	25% Manitol e 75% Sacarose	24,1g de Manitol e 124,35g de Sacarose
Tratamento 5	100% Sacarose	165,8g de Sacarose

**Tabela 3:** Concentrações e misturas de condicionadores hídricos utilizados na pesquisa, para -1,0 Mpa a 25°C.

Tratamentos	Misturas	Dose para 1 litro de meio (g)
Tratamento 1	100% Manitol	70,1g de Manitol
Tratamento 2	75% Manitol e 25% Sacarose	52,575g de Manitol e 30,875 de Sacarose
Tratamento 3	50% Manitol e 50% Sacarose	35,05g de Manitol e 61,75g de Sacarose
Tratamento 4	25% Manitol e 75% Sacarose	17,525g de Manitol e 92,625g de Sacarose
Tratamento 5	100% Sacarose	123,5g de Sacarose

A atividade de água dessas misturas foram medidas através do equipamento WP4C, onde pequenas amostras de cada meio foram analisadas.

**Tabela 4:** Potencias hídricos de cada mistura descritas nas Tabelas 2 e 3 a 25°C.

Tratamento	Potencial de -1,4MPA	Potencial de -1,0
T1	0,989	0,982
T2	0,985	0,982
T3	0,99	0,984
T4	0,984	0,988
T5	0,982	0,987

### 3.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em DIC (Delineamento inteiramente casualizado), com tratamentos e repetições variando de acordo com cada análise. Os dados foram submetidos à análise de variância com a ajuda do programa Sisvar® versão 5.3 (FERREIRA, 2011), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

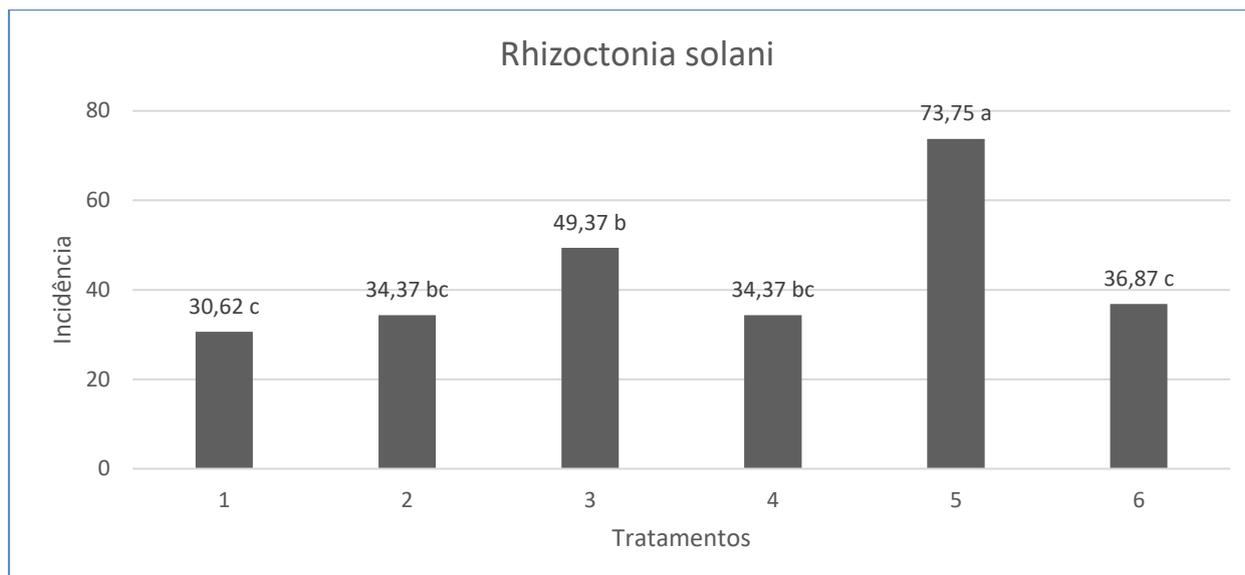
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliações das sementes de algodão e do fitopatógeno *Rhizoctonia solani* submetidos as diferentes concentrações e restritores

Na porcentagem de incidência de *Rhizoctonia solani* em sementes de algodão, que passaram pelo processo de infecção, houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos utilizados. Observa-se que no tratamento em que se utilizou 100% de sacarose (T5) os valores percentuais de incidência foram maiores, média de 73,75%, quando comparados aos outros tratamentos utilizados em teste. Diferentemente do que aconteceu com o tratamento em que se utilizou 100% de manitol (T1), de acordo com resultados observa-se que porcentagem de incidência, desse tratamento foi menor, em média 30,62% em comparação aos outros tratamentos. Já os tratamentos T2, T4 e T6 apresentaram níveis de incidência consideráveis, entretanto, não apresentaram diferenças estatísticas entre si, como demonstrado na Figura 1 e Tabela 4.

A testemunha T6, em que utilizou-se BDA, apesar de não conter restritor hídrico, apresentou 36,87% de incidência, uma vez que contém em sua composição fontes C e N. Muitos fungos utilizam os meios naturais, semi-sintéticos e sintéticos para o seu desenvolvimento, os quais fornecem determinadas substâncias necessária que funcionam como estimuladores de crescimento e reprodução (HAWKER, 1957; LILLY, 1951).

Cutrim, F.A (2006) utilizando diferentes meios de cultura no crescimento de *Penicillium clerotigenum* observaram que o uso de sacarose proporcionou maior crescimento deste fungo, assim como ocorreu neste estudo. Este fato da sacarose promover o crescimento fúngico é devido a este composto possuir fonte de carbono adequada para desenvolvimento do fitopatógenos (SILVA e TEIXEIRA, 2012). Segundo Pinheiro (2015), alguns fungos podem obter maior produção de biomassa quando utilizada a sacarose como fonte de carbono. Entretanto, segundo este mesmo autor, vale ressaltar que a concentração de sacarose pode agir de forma diferente para cada fitopatógeno.

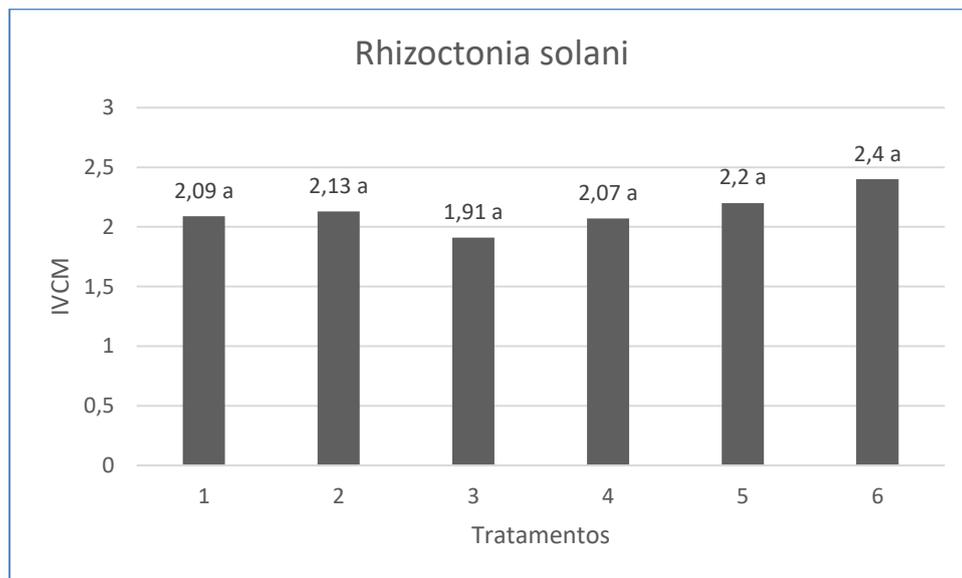


**Figura 1:** Porcentagem de incidência de *Rhizoctonia solani* em sementes de algodão inoculadas em diferentes concentrações e misturas de condicionadores hídricos sendo T1 (100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (Ágar e Água).

As sementes de algodão não apresentaram germinação durante o período que ficaram em contato com as diferentes concentrações e misturas, ao longo dos 7 dias de análise. As diferentes concentrações não alteraram o potencial hídrico do meio (-1,0 Mpa), conseqüentemente, de acordo com os resultados, não houve germinação das sementes de algodão como é evidenciado pela medição da atividade de água pelo aparelho WP4C (Tabela 4). Segundo Machado et. al (2007), o emprego da restrição hídrica nos potenciais hídricos de -0,6 MPa, -0,8 MPa, -1,0 MPa e -1,2 MPa, reduz o processo de germinação de sementes e o comprimento de plântulas de várias culturas, dentre elas o algodão. Alguns trabalhos utilizados como referência na literatura demonstraram que o uso de restrição hídrica para inocular sementes foi eficaz, principalmente, no controle da germinação das sementes (CARVALHO, 1999; COSTA et al., 2003; CARVALHO et al., 2004). Segundo Carvalho et.al (2009) o uso da restrição hídrica na incubação de testes de sanidade é suficiente para retardar a germinação das sementes por um período de tempo necessário para o desenvolvimento do patógeno, que é aproximadamente sete dias.

Em relação ao Índice de Velocidade de Crescimento Micelial, não houve diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos utilizados. Este resultado é de grande importância para este estudo, pois mostra que o uso da sacarose como restritor não impede o crescimento e

o desenvolvimento do fungo. Segundo Gao & Shain (1995), alguns fungos podem ter seu crescimento micelial favorecido em meio com sacarose, se comparados com outros meios contendo restritores hídricos como NaCl, KCl e NaSO<sub>4</sub>, devido a utilização da sacarose como fonte adicional de energia, principalmente em potenciais osmóticos mais negativos, como sendo os fatores responsáveis pelo crescimento diferenciado do fungo (MACHADO, 2007).



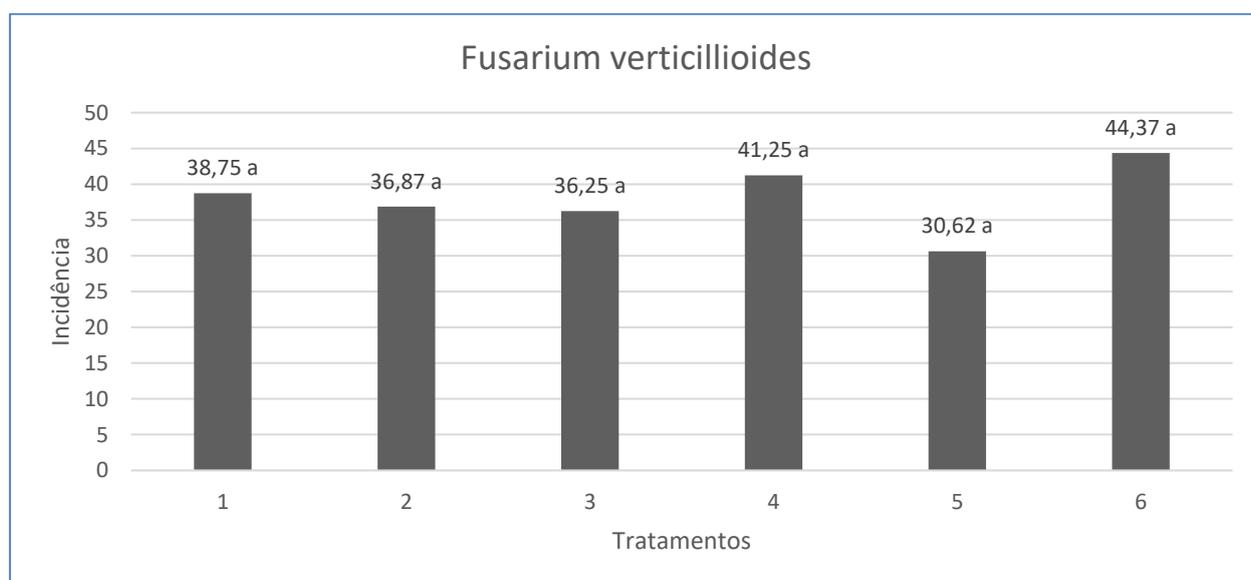
**Figura 2:** Valores do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Rhizoctonia solani* em diferentes misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (BDA, Ágar e Água).

#### 4.2. Avaliações das sementes de milho e do fitopatógeno *Fusarium verticillioides* submetidos as diferentes concentrações e restritores

Na análise de sanidade das sementes de milho inoculadas e submetidas a diferentes misturas de condicionadores hídricos, não houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) na porcentagem de incidência de *Fusarium verticillioides* (Figura 3 e Tabela 6).

Entre os tratamentos, numericamente, o T6 foi o que proporcionou a maior incidência com 44,37% e o tratamento T5 (100% de sacarose) apresentou 30,62% de aparecimento do patógeno. Apesar da diferença de 13,75%, esses dois tratamentos foram considerados iguais estatisticamente quando comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Os demais tratamentos demonstraram valores intermediários entre 44,37% e 30,62%, apresentando assim uma incidência considerável, como demonstrado no experimento com o patógeno *Rhizoctonia solani*. Este resultado reafirma a possibilidade do uso da sacarose como complemento ou até mesmo como substituição do manitol em trabalhos futuros na patologia de sementes. Neste caso, o potencial osmótico não interfere de forma negativa na incidência e na área superficial da semente coberta por propágulos do patógeno (CARVALHO et. al., 2009)

A incidência demonstrada em todos os tratamentos contendo misturas entre manitol e sacarose sugere uma boa relação entre o fungo e os meios utilizados. Como já foi concluído por Machado (2004), os meios que promovem potenciais adequados, por exemplo de -1,4 Mpa para sementes de milho, nos ajudam na obtenção e detecção do fungo associados as sementes dessa cultura por diferentes períodos.



**Figura 3:** Porcentagem de incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho

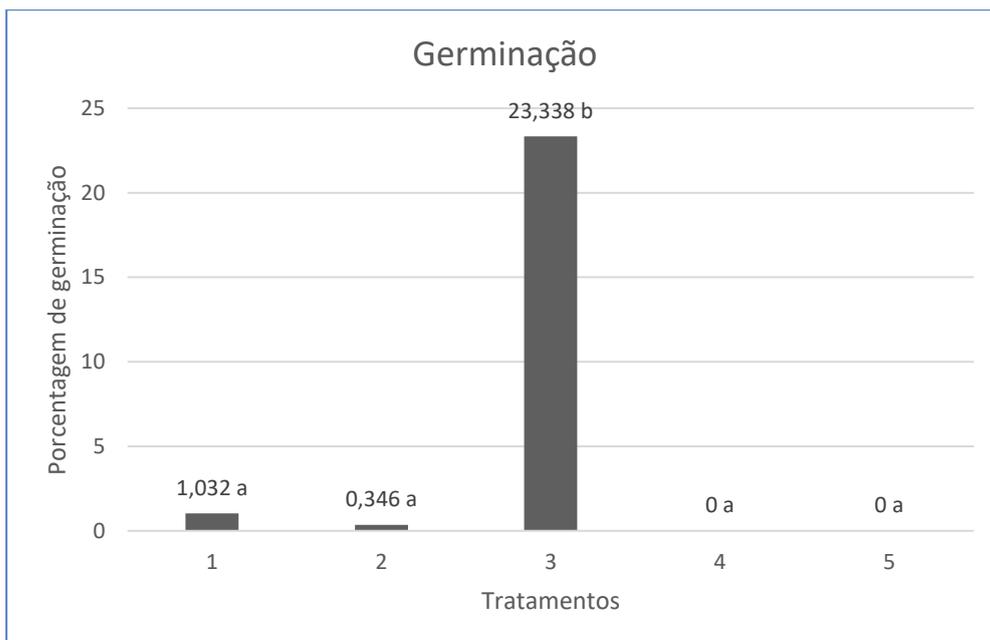
inoculadas em diferentes concentrações e misturas de condicionadores hídricos sendo T1(100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (Ágar e Água).

Na Figura 4 e Tabela 7, observa-se, diferentemente do que aconteceu com as sementes do algodão, houve germinação das sementes de milho em alguns tratamentos utilizados neste experimento. Segundo os resultados, os tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram porcentagem de germinação de 1,032%, 0,346% e 23,33%, respectivamente. Observa-se que T3, em que utilizou-se 50% de sacarose e 50% de manitol, apresentou a porcentagem de germinação das sementes de milho superior, estatisticamente ( $P < 0,05$ ), quando comparado a outros tratamentos.

Entretanto, observa-se que nos tratamentos T4 (25% manitol) e T5 (100% sacarose) não houve germinação das sementes de milho, mostrando-se melhores para uso em experimentos futuros em patologia de sementes.

O fato de haver uma alta germinação no tratamento 3, possivelmente, é devido ao fato de que a mistura sacarose e manitol na mesma concentração não proporcionou um potencial hídrico ideal ou ainda modificou o potencial a ponto de permitir a germinação das sementes de milho. Esse fato pode estar relacionado com as diferenças químicas ou de ação desses solutos, e também, às diferenças de potencial hídrico de equilíbrio que é específico entre a semente e o meio externo (HEYDECKER, et al. 1975 e BRADFORD, 1986). Outro fator importante está relacionado ao vigor das sementes que pode variar em função das características das sementes de cada espécie e entre lotes de um mesmo cultivar (COUTINHO et al., 2001).

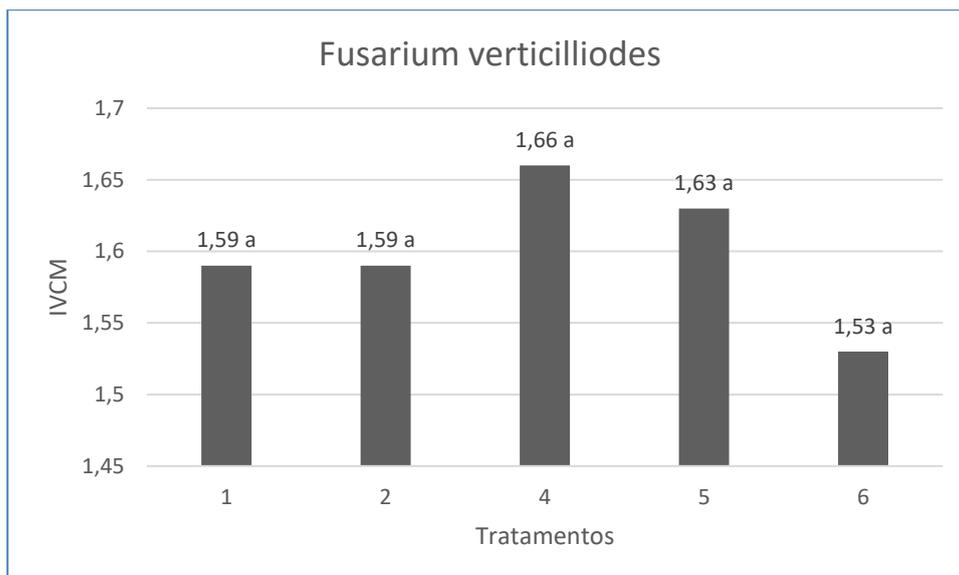
Segundo Araujo et. al. (2012) um dos fatos fundamentais e mais importantes da restrição hídrica é o impedimento da germinação e conseqüentemente emissão de radícula durante o período de incubação, pois favorece o aparecimento e a visualização do patógeno, por um período ideal, nas sementes.



**Figura 4:** Porcentagem de germinação de sementes de milho submetidas a diferentes concentrações e misturas de condicionadores hídricos sendo T1 (100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose).

O IVCN do *Fusarium verticillioides* não diferiu estatisticamente, quando comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), entre os tratamentos, como observado na Figura 5, apesar de T1, T2, T4 e T5 terem apresentado, numericamente, um valor maior que o da própria testemunha (IVCM de 1,53). Segundo COUTINHO et al.(2001), este fato pode ser explicado devido a um melhor ajuste osmótico da célula fúngica propiciado pela absorção dos solutos gerando, um maior turgor para expansão celular, assim como já ocorreu com o patógeno *F. oxysporum* sp. *phaseoli* em outros trabalhos. Fato de extrema importância para este trabalho, já que as misturas e concentrações não afetaram o crescimento da espécie de *Fusarium* utilizada neste estudo.

Observa-se que o IVCN não foi realizado em tratamento 3 (50% de manitol + 50% de sacarose), devido ao resultado insatisfatório na análise de germinação com sementes de milho.

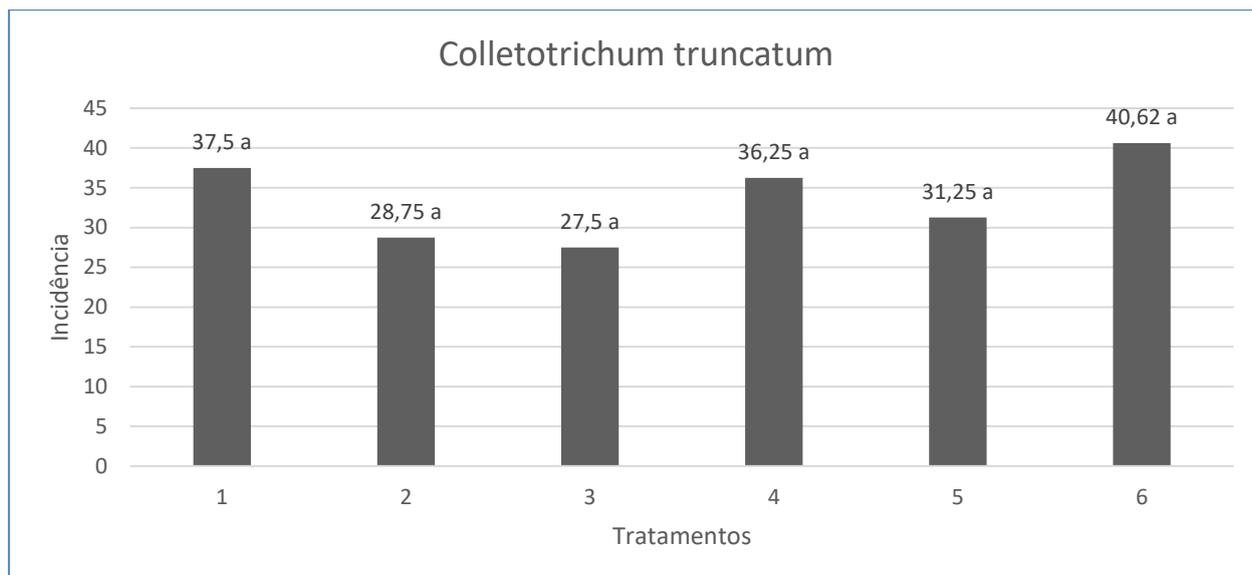


**Figura 5:** Valores do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Fusarium verticillioides* em diferentes misturas de condicionadores hídricos sendo T1 (100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (BDA, Ágar e Água).

O resultado de incidência e do IVCm de *Fusarium verticillioides*, demonstrados neste trabalho, sugere que a sacarose utilizada de forma isolada ou em mistura com o manitol, apesar de não proporcionar diferenças nestes testes, comprova a eficácia deste produto na utilização como restritor hídrico em trabalhos de patologia de sementes.

#### 4.3. Avaliações das sementes de soja e do fitopatógeno *Colletotrichum truncatum* submetidos as diferentes concentrações e restritores

Na avaliação da incidência de *Colletotrichum truncatum* nas sementes de soja, não houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos quando comparados com a testemunha (Figura 6). Entretanto, nota-se que as diferentes concentrações e misturas, utilizadas neste estudo, conseguiram manter a incidência ideal de *Colletotrichum* para uso em futuros trabalhos. Observa-se que a testemunha (T6) apresentou, numericamente, alta incidência em média 40,62%, ainda de acordo com os resultados, nota-se que os outros tratamentos, exceto o T3, mantiveram a porcentagem de incidência acima dos 30%, sendo esta a porcentagem ideal utilizada nos trabalhos de patologia de sementes.

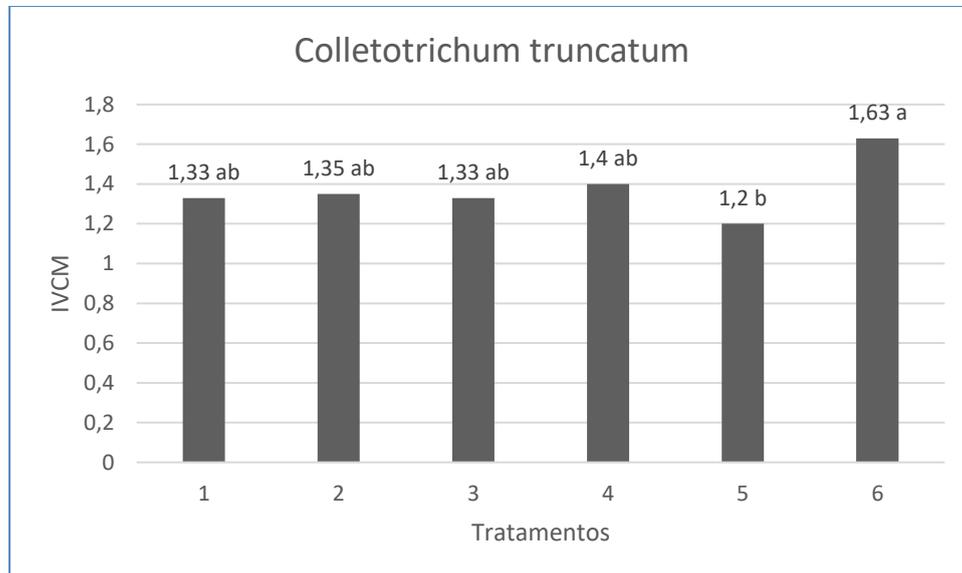


**Figura 6:** Porcentagem de incidência de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja inoculadas em diferentes concentrações e misturas de condicionadores hídricos sendo T1 (100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (Ágar e Água).

As sementes de soja, assim como as sementes de algodão, não germinaram ao longo de 7 dias em contato com as misturas em estudo. A utilização da restrição hídrica, em potencial de -0,6 a -1,0 MPa, é um procedimento promissor que impede ou reduz a germinação de sementes de soja visando à detecção dos principais fungos e a utilização das sementes por mais tempo (MACHADO et.al,2014). Machado et. al (2001) comprovaram a eficiência da técnica quando inocularam sementes de soja com *Colletotrichum truncatum*, sendo esta de quase 100% de infecção. Pereira et.al, (2009), também, em seu estudo com *Colletotrichum truncatum* e tratamento de sementes observaram que nas sementes sem tratamento houve uma alta incidência desse patógeno após a inoculação, constatando assim a eficiência da técnica de restrição hídrica.

Em relação ao IVCm do *Colletotrichum truncatum* da soja, houve diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. Observa-se que o tratamento em que se utilizou 100% de sacarose apresentou menor crescimento em comparação aos outros tratamentos, entretanto não impediu o crescimento do patógeno em estudo (Figura 7 e Tabela 100). O menor índice de velocidade de crescimento micelial ocorreu no tratamento em que se utilizou 100% de sacarose, possivelmente, está relacionado com a permeabilidade seletiva de membranas, compatibilidade ou toxidez de solutos, tanto externamente quanto internamente à

membrana celular (COUTINHO et al., 2001). Também, de acordo com resultados de diversos trabalhos o crescimento do patógeno em meios com restrição hídrica pode ser variável de espécie para espécie (DUNIWAY,1979).



**Figura 7:** Valores do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Colletotrichum truncatum* em diferentes misturas de condicionadores hídricos sendo T1 (100% Manitol), T2 (75% Manitol e 25% Sacarose), T3 (50% Manitol e 50% Sacarose), T4 (25% Manitol e 75% Sacarose) e T6 (BDA, Ágar e Água).

## 5. CONCLUSÕES

O pré-condicionamento de sementes utilizando sacarose, pura ou em mistura, como restritor hídrico, revela ser um procedimento eficaz para obtenção de sementes infectadas por importantes fungos como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum truncatum*.

Em substratos de cultivo fúngico contendo a sacarose pura ou em mistura, os potenciais hídricos dos diferentes meios não varia e o crescimento micelial dos fungos em estudo não é prejudicado.

O uso da sacarose manteve o potencial hídrico ao nível de não haver germinação das sementes em quase todos os tratamentos exceto no tratamento 3 (50% Manitol e 50% Sacarose) para *Fusarium verticillioides*, proporcionando, assim, como esperado, índices de infecção ideal das sementes de algodão, milho e soja pelos fungos testados, sem inviabilizar as sementes para usos posteriores.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, E.A.S., VIEIRA, M.G.G.C. & SANTOS, C.D. Avaliação da influência de diferentes potenciais osmóticos no índice de crescimento de *Fusarium moniliforme* Sheldon, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* em meio de cultura. Anais, 15. **Seminário Panamericano de Semillas**, e 3. **Workshop sobre Marketing em Sementes e Mudás**, p.93, 1996.

BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; ALVES, M. C.; CORRÊA, C. L. Desempenho de sementes de algodão submetidas à deficiência hídrica e presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Bioscience Journal**, v. 30, n.2, p.421-28, 2014.

BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C. Introdução a patologia de sementes e testes convencionais de sanidade de sementes para detecção de fungos fitopatogênicos. **Informativo ABRATES**, v.20, n.3, p.74-77, 2010.

BARROS, L. S.; GUIMARAES, S. C.; KOBAYASTI, L.; MENDONCA, E. A. F. Restrição hídrica na inoculação artificial de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Scientia Plena**, v. 10, p. 01-06, 2014.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009b. 395p.

CAMARGO, M. P.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Efficiency of Blotter test and agar culture medium to detect *Fusarium graminearum* and *Pyricularia grisea* in wheat seeds. **Journal of Seed Science**, v.39, n.3, p.297-302, 2017.

CARVALHO, E. M. et al. Uso da restrição hídrica na detecção de *Alternaria dauci* e *Alternaria radicina* em sementes de cenoura (*Daucus carota*). **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 216-222, 2009

CARVALHO, J.C.B. Uso da restrição hídrica na inoculação de

*Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).  
**Dissertação de Mestrado.** Lavras MG. Universidade Federal de Lavras. 1999.

CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. (eds.). Sementes: ciência, tecnologia e produção. 3.ed. Campinas: **Fundação Cargill**, 1988. 424p.

CHITARRA, L. G.; GOULART, A. C. P.; ZONARO, M. F. Tratamento de sementes de algodoeiro com fungicidas no controle de patógenos causadores de tombamento de plântulas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 168-167, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **8º Levantamento – Safra 2018/2019**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 18 mai.2019

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Os resultados da safra 2017/18: A receita bruta e líquida operacional dos produtores de algodão, amendoim e soja / responsável técnico Aroldo Antonio de Oliveira Neto. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 02 de abr 2019: **Conab**, 2018.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORILE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseolis* em sementes de algodoeiro através de restrição hídrica. **Ciência and Agrotecnologia**, v.27,n.5, p.1023-1030, 2003.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORILE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseolis* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência and Agrotecnologia, Lavras**, v.27,n.5, p.1023-1030, 2003.

COUTINHO, W. M.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M.; FERREIRA, D. F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio agar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

COUTINHO, W.M.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, C.F.; MACHADO, J.C. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.6, p.458-464, 2007.

CUTRIM, Flávia de Aquino et al . Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summaphytopathol.**,

Botucatu , v. 32, n. 1, p. 85-88, Mar. 2006.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO,PORTARIA Nº 240, DE 12 DE MARÇO DE 2019).

FANTAZZINI, T.B.; GUIMARAES, R. M.; CLEMENTE, A. C. S.; CARVALHO, E. R.; MACHADO, J. C. *Fusariumverticillioides* inoculum potencial and its relationwiththephysiologicalstoredcornseedquality. **Bioscience Journal**,v. 32, n.5, p.1254-1262,2016.

FAO. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. Disponível em <[http:fao.org](http://fao.org)>. Acesso em 01 Abr 2017.

GAO, S. & SHAIN, L. Effect of osmotic potential on virulent and hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. *Canadian Journal of Forest Research* 25:1024-1029. 1995.

GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodoeiro com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctoniasolani*, sob condições de casa de vegetação. **Tropical PlantPathology**, v. 33, n.5, p .394-398, 2008.

Hawker, L.E. **The physiologyofreproduction in fungi**. London: Cambridge University Press, 1957. 127p.

HEIDECKER, W.; HIGGINS, J. & TURNER, Y.J. Invigoration ofseeds? **Seed Science and Technology**, Zürich, v.3, n.3/4, p.881-888, 1975.

[http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/66952742/do1-2019-03-14-portaria-n-240-de-12-de-marco-de-2019-66952457](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/66952742/do1-2019-03-14-portaria-n-240-de-12-de-marco-de-2019-66952457)

Lilly, V.G.; Barnett, H.L. **Physiologyofthefungi**. New York: McGraw-Hill, 1951. 464p.

MACHADO, A.Q., MACHADO, J.C., VIEIRA, M.D.G.G.C., CASSETARI NETO, D.; SOUZA, M.V. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n. 32, p.408-414, 2007.

MACHADO, A.Q., MACHADO, J.C., VIEIRA, M.D.G.G.C., CASSETARI NETO, D. & SOUZA, M.V. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32:408-414. 2007.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypiumhirsutum*). **Revista Brasileira de sementes**, v. 26, n. 1, p. 60-65, 2004.

MACHADO, José da Cruz et al. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. **Rev. bras. sementes**, Pelotas, v. 25, n. 2, p. 77-81, Dec. 2003. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-31222003000400011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222003000400011&lng=en&nrm=iso)>. access on 19 May 2019.

MANANDHAR, J.B; HARTMAN, G.L. 1999 Anthracnose. In: SINCLAIR, J.B. & RUPE, J.C. Compendium of Soybean Diseaseed **4rd American phytopathological Society**, v.1, n.1, p. 13–14, 1999.

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

PPINHEIRO, J. B. Prospecção de fungos e meios de cultura alternativos para produção de exopolissacarídeos. 2015. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos)** - Universidade Federal de São João Del-Rei.

Revista Agro@mbiente On-line, v. 6, n. 1, p. 47-52, janeiro-abril, 2012

ROGÉRIO, F.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; BARBIERI, M. C.; BRAGANÇA, C. A.; SEIXAS, C. D.; ALMEIDA, A. M.; MASSOLA, N. S. Phylogeny and variability of *Colletotrichumtruncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **JournalofAppliedMicrobiology**, v. 122, n. 2, p. 402-415, 2016.

SILVA, A. F. Desempenho de cultivares de algodão em Alegrete Rio Grande do Sul. 2012. 73 fTese (**Doutorado em Ciência e tecnologia de sementes**). Universidade Federal de Pelotas, 2012.

SILVA, J.L.; TEIXEIRA, R.N.V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusariumsolani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 47-52, janeiro-abril, 2012