

FERNANDO SARTORI PEREIRA

TRATAMENTO DE SEMENTES PARA O MANEJO DO MOSAICO COMUM DO TRIGO E CARACTERIZAÇÃO DO VETOR VIRAL *Polymyxa graminis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Nascimento da Silva

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Pereira, Fernando Sartori

Tratamento de sementes para o manejo do mosaico
comum do trigo e caracterização do vetor viral
Polymyxa graminis / Fernando Sartori Pereira. -
Lages, 2018.

77 p.

Orientador: Fábio Nascimento da Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal, Lages, 2018.

1. Triticum aestivum. 2. Polymyxa graminis. 3.
Vírus. 4. Tratamento de sementes. 5. Caracterização
molecular . I. da Silva, Fábio Nascimento. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

FERNANDO SARTORI PEREIRA

TRATAMENTO DE SEMENTES PARA O MANEJO DO MOSAICO COMUM DO TRIGO E CARACTERIZAÇÃO DO VETOR VIRAL *Polymyxa graminis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca examinadora:

Orientador: Fábio Nascimento da Silva

Professor Dr. Fábio Nascimento da Silva

Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UDESC).

Membro: Ricardo Trezzi Casa

Professor Dr. Ricardo Trezzi Casa

Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UDESC).

Membro: Douglas Lau

Pesquisador Dr. Douglas Lau

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo).

Lages, 16 de Julho de 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

A meus pais Dioraci e Renita e toda minha família, pelo amor, apoio, sempre com palavras de incentivo para realização desse trabalho.

Ao meu orientador professor Dr. Fábio Nascimento da Silva pela orientação, dedicação, amizade, paciência e pela oportunidade de trabalhar na área de Virologia Vegetal.

Ao professor Dr. Ricardo Trezzi Casa, por ter me aceitado no programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, além de todo o apoio e dedicação desde o tempo da graduação.

Ao pesquisador Dr. Douglas Lau da Embrapa Trigo pela parceria, paciência, amizade e ensinamentos na área de Virologia na Cultura do Trigo.

A minha colega Juliana e meu colega Lucas pela parceria, ajuda e amizade durante a realização do Mestrado.

A toda equipe dos Laboratórios de Virologia, Fitopatologia e Análise de Sementes pela amizade e ajuda durante esses anos.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, aos professores e funcionários pela oportunidade da realização do Mestrado em Produção Vegetal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao pesquisador Dr. Paulo Kuhnem da Biotrigo Genética, e a toda empresa Biotrigo Genética pela parceria e amizade.

A empresa Embrapa Trigo, especialmente aos colaboradores Vânia, Odirlei, Maria, Elias pela amizade e ajuda na condução do ensaio de campo.

Aos amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Meu muito obrigado!

“Se você acha que a educação é cara, tenha a
coragem de experimentar a ignorância.”

Derek Bok

RESUMO

PEREIRA, Fernando S. **Tratamento de sementes para o manejo do mosaico comum do trigo e caracterização do vetor viral *Polymyxa graminis***. 2018. 77 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2018.

A cultura do trigo (*Triticum aestivum*) é cultivada no Brasil principalmente na região Sul. Entre as doenças que afetam essa cultura está a virose do mosaico comum do trigo. É relatada a transmissão do agente causal dessa virose pelo plasmodioforomiceto *Polymyxa graminis*. Para o tratamento de sementes utilizaram-se alguns fungicidas pertencentes a diferentes grupos químicos, agentes de biocontrole e indutor de resistência. O primeiro estudo teve como objetivo avaliar a germinação, vigor e sanidade das sementes, das cultivares TBIO Toruk e BRS Guamirim. O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia e Laboratório de Sementes da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, na safra 2017. Na análise da germinação não foi observada diferença para BRS Guamirim, no entanto, para TBIO Toruk houve diferença entre testemunha, azoxistrobina e *Bacillus amyloliquefaciens*. Os resultados superiores no teste de vigor apresentaram: piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil (88,5%), tiofanato metílico + fluazinam (87,7%), Carboxamida A (79,2%) não diferenciando da testemunha (84,0%) para TBIO Toruk. Na patologia de sementes, os principais fungos detectados foram: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Drechslera* spp., sendo que o tratamento tiofanato metílico + fluazinam apresentou o melhor resultado: para *Alternaria* spp. (10,6%), *Aspergillus* spp. (0%), *Drechslera* spp. (0,5%) para TBIO Toruk e para BRS Guamirim: *Alternaria* spp. (8,5%), *Aspergillus* spp. 0%, *Drechslera* spp. (1,4%). Posteriormente, foi realizado ensaio a campo com 13 tratamentos de sementes nas duas cultivares para verificar o comportamento de cada tratamento na emergência de plântulas, massa fresca de raiz e parte aérea, incidência de mosaico comum em três épocas e massa de grãos. Essas análises foram realizadas na área da Embrapa trigo em Passo Fundo no estado do Rio Grande do Sul, sendo instalado o ensaio em local com histórico da doença. Com o intuito de caracterizar o plasmodioforomiceto associado a plantas de trigo com sintomas de mosaico comum foi realizada a caracterização molecular do possível vetor, sendo utilizadas raízes de plantas coletadas do ensaio apresentando sintomas de mosaico das cultivares TBIO Toruk e BRS Guamirim. Utilizando microscópio ótico, foram observados no sistema radicular de plantas sintomáticas estruturas do plasmodioforomiceto, sendo visualizados zoósporo encistado e zoosporângio. Parte das raízes foram processadas no Laboratório de Virologia da Universidade do Estado de Santa Catarina em Lages, SC, onde foi realizado a extração de DNA e RNA, reações de PCR e sequenciamento. As análises moleculares confirmaram a presença de *P. graminis* em raízes de plantas com mosaico comum infectadas por Wheat stripe mosaic virus (WhSMV, família *Benyviridae*), sugerindo a transmissão desse vírus pelo plasmodioforomiceto *P. graminis*.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*. Virose. Vetor. Sementes.

ABSTRACT

PEREIRA, Fernando S. **Seed treatment for soil-borne wheat mosaic disease management and characterization of the viral vector *Polymyxa graminis***. 2018. 77 p. Dissertation (Master's degree in Plant Production – Research área: Plant protection and agroecology). Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Plant Production, Lages, 2018.

Wheat (*Triticum aestivum*) is cultivated mainly in southern Brazil. Among diseases that affect wheat it can be mentioned soil-borne wheat mosaic disease (SBWMD), caused by viruses. Transmission of the virus by plasmodiophorid *Polymyxa graminis* was reported. For the wheat seeds treatment were used fungicides belonging to different chemical groups, biocontrol agents and resistance inducer. The first study had as objective to evaluate the germination, vigor and sanity of the seeds, verifying the seeds physiological quality besides identifying and quantifying fungi infecting seeds of TBIO Toruk and BRS Guamirim cultivars. The first study was carried out in the Phytopathology and Seed Laboratories of the State University of Santa Catarina, Lages, SC, in the 2017 season. In the germination analysis, no difference was observed for BRS Guamirim. For TBIO Toruk there was difference between control treatment, azoxystrobin and *Bacillus amyloliquefaciens*. The superior results in the vigor test to TBIO Toruk cultivar were obtained in the following treatments: pyraclostrobin + methyl thiophanate + fipronil (88.5%), methyl thiophanate + fluazinam (87.7%), carboxamida A (79.2%) not differentiating from the control (84.0%). The main fungi detected in the seed pathology were: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Drechslera* spp., And the thiophanate methyl + fluazinam treatment presented the best result: for *Alternaria* spp. (10.6%), *Aspergillus* spp. (0%), *Drechslera* spp. (0.5%) for TBIO Toruk and for BRS Guamirim: *Alternaria* spp. (8.5%), *Aspergillus* spp. 0%, *Drechslera* spp. (1.4%). A field assay was carried out with 13 seed treatments in the two cultivars to verify the effect of each treatment in emergence of seedlings, fresh root and shoot mass, incidence of SBWMD in three seasons and grain mass. These analyzes were carried out in Embrapa Wheat in Passo Fundo municipality, Rio Grande do Sul State, southern Brazil, and the assay was installed in a place with history of the disease. In order to characterize the plasmodiophorid associated with wheat plants with symptoms of SBWMD, the morphological and molecular characterization of the putative vector was performed. For this, roots of the TBIO Toruk and BRS Guamirim wheat plants displaying mosaic symptoms were used). Plasmodiophoroid structures as zoospore and zoosporangium were observed in the root system of symptomatic plants. Part of the roots were processed in the Laboratory of Virology of the State University of Santa Catarina in Lages, SC, where the extraction of DNA and RNA, PCR reactions and sequencing were performed. Molecular analyzes confirmed the presence of *P. graminis* in roots of plants infected by Wheat stripe mosaic virus (WhSMV, *Benyviridae* family), suggesting the transmission of this virus by *P. graminis*.

Keywords: *Triticum aestivum*. Virus. Vector. Seeds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plântulas de trigo da cultivar BRS Guamirim apresentando redução de parte aérea e raiz nos diferentes tratamentos de sementes do teste de envelhecimento acelerado (Lages, SC, 2017).....	41
Figura 2 - Sintoma de mosaico comum do trigo em folha da cultivar TBIO Toruk (A), imagem do ensaio (B) (Passo Fundo, RS, 2017).....	50
Figura 3 - Precipitação pluviométrica em milímetro (mm), no município de Passo Fundo – RS.....	56
Figura 4 - Caracterização do vetor <i>Polymyxa graminis</i> em raízes infectadas de trigo (cvs. TBIO Toruk e BRS Guamirim) em diferentes estágios: zoósporo encistado (A), formação de zoosporângios (B).....	62
Figura 5 - Análise de eletroforese para detecção molecular de <i>Polymyxa graminis</i> e Wheat stripe mosaic virus (WhSMV) em cultivares TBIO Toruk (1) e BRS Guamirim (2).....	63
Figura 6 - Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências de parte do DNA ribossomal nuclear 5.8S e Internal transcribed spacer (ITS1) de <i>Polymyxa graminis</i> , incluindo isolados brasileiros caracterizados neste estudo (em negrito), e sequências baixadas do GenBank.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Produtos utilizados para os tratamentos das sementes de trigo (Lages, SC, 2017).....	36
Tabela 2 -	Porcentagem de germinação e envelhecimento acelerado de sementes de trigo das cultivares TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicida, indutor de resistência e agentes de biocontrole em tratamentos de sementes (Lages, SC, 2017).....	40
Tabela 3 -	Incidência de fungos em cultivar de trigo TBIO Toruk, em função da aplicação de fungicidas e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Lages, SC, 2017).....	43
Tabela 4 -	Incidência de fungos em cultivar de trigo BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Lages, SC, 2017).....	44
Tabela 5 -	Produtos utilizados para os tratamentos das sementes de trigo, (Lages, SC, 2017).....	48
Tabela 6 -	Plantas emersas a campo em cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).....	53
Tabela 7 -	Massa fresca de raiz e parte aérea 42 dias após emergência de cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).....	55
Tabela 8 -	Incidência e controle de mosaico comum do trigo em estágio de alongamento em cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).....	57
Tabela 9 -	Incidência de mosaico comum do trigo em estágio de florescimento em cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).....	59
Tabela 10 -	Massa de grãos das cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	ORIGEM, FENOLOGIA, IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E DOENÇAS DO TRIGO.....	21
2.2	VIROSES EM TRIGO.....	24
2.2.1	Mosaico comum do trigo.....	25
2.2.2	Família <i>benyviridae</i>.....	27
2.2.3	Vetor.....	28
2.2.4	Tratamento de sementes na cultura do trigo.....	30
3	CAPÍTULO 1 TESTES FISIOLÓGICOS E QUANTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS INFECTANDO SEMENTES DE TRIGO SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS.....	33
3.1	RESUMO.....	33
3.2	INTRODUÇÃO.....	34
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.3.1	Tratamento de sementes.....	35
3.3.2	Testes de germinação e vigor.....	36
3.3.3	Teste de patologia de sementes.....	37
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
3.4.1	Testes de germinação e vigor.....	38
3.4.2	Patologia de sementes.....	42
3.5	CONCLUSÕES.....	44
4	CAPÍTULO 2 EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS DE SEMENTES NO MANEJO DE MOSAICO COMUM DO TRIGO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VETOR.....	45
4.1	RESUMO.....	45
4.2	INTRODUÇÃO.....	46
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.3.1	Ensaio de campo.....	47
4.3.1.1	<i>Tratamento de sementes.....</i>	47
4.3.1.2	<i>Condução do ensaio.....</i>	48
4.3.1.3	<i>Contagem de plantas emersas.....</i>	49

4.3.1.4	<i>Massa fresca de raiz e parte aérea</i>	49
4.3.1.5	<i>Avaliação de incidência da virose</i>	50
4.3.1.6	<i>Rendimento de grãos</i>	50
4.3.2	Caracterização do vetor	50
4.3.2.1	<i>Observação de Polymyxa graminis nas raízes de trigo</i>	50
4.3.2.2	<i>Teste de PCR para P. graminis</i>	51
4.3.2.3	<i>Análise filogenética de P. graminis</i>	51
4.3.3	Detecção do vírus	52
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.4.1	Ensaio de campo	52
4.4.1.1	<i>Plantas emersas</i>	52
4.4.1.2	<i>Massa frescas de raiz e parte aérea</i>	53
4.4.1.3	<i>Incidência de mosaico comum do trigo</i>	55
4.4.1.4	<i>Rendimentos de grãos</i>	59
4.4.2	Caracterização do vetor	61
4.4.2.1	<i>Observação de P. graminis nas raízes de trigo</i>	61
4.4.2.2	<i>Teste de PCR das amostras para detecção de P. graminis e do vírus</i>	62
4.4.2.3	<i>Análise filogenética de P. graminis</i>	63
4.5	CONCLUSÕES.....	64
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU) em 2015, o mundo abrigava aproximadamente 7 bilhões de pessoas, havendo uma tendência de crescimento, estima-se que em 2030 haverá 8,6 bilhões, e em 2100 11 bilhões de pessoas no planeta (ONU, 2017). Com esse crescimento populacional, o grande desafio será aumentar a produção de alimentos para atender essa demanda crescente.

Neste contexto, o trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma das principais culturas alimentares, cultivado em diversos ambientes e regiões geográficas. Este cereal é o alimento básico para grande parte dos seres humanos, estando presente na base da cadeia alimentar fornecendo energia, lipídios, proteínas, vitaminas e minerais (GWIRTZ; WILLYARD; MCFALL, 2014). Esse cereal ocupa cerca de 17% da terra agricultável do mundo e corresponde aproximadamente 30% da produção mundial de grãos. Cerca de 80% do consumo mundial de trigo é utilizado para alimentação humana em forma de pães, massas, biscoitos, tortas e bolos; já, na indústria é utilizado para fabricação de misturas adesivas, fármacos e cosméticos. Na alimentação animal o cereal possui uso na forma de forragem, pastejo direto, uso de grãos e farelo de trigo (MORI, 2016).

O aumento da produtividade é atribuído a vários fatores, como o melhoramento genético, adubação, melhores técnicas de manejo da cultura, além da proteção contra danos causados por plantas daninhas, pragas e doenças.

Entre as doenças do trigo, as infecções por vírus afetam processos fisiológicos das plantas infectadas, podendo ser responsáveis por reduções significativas na produção (MEHTA, 1978). Uma das principais doenças de etiologia viral na cultura do trigo, o mosaico comum do trigo é atribuído principalmente ao *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) (CAETANO; KITAJIMA; COSTA, 1978). Sendo este vírus transmitido pela espécie *Polymyxa graminis* (LIEDINGHAM, 1939), um parasita obrigatório que infecta raízes de espécies da família Poaceae (CHEN; WILSON, 1995).

Os primeiros sintomas dessa doença são observados nos estágios iniciais da cultura do trigo, geralmente ocorrendo em reboleiras. Em safras em que ocorrem maiores precipitações pluviométricas em épocas próximas a semeadura/emergência e estádios iniciais de desenvolvimento da cultura, ocorrem maiores incidências da

doença. Atualmente, a recomendação mais segura ao produtor é semear cultivares com resistência genética ao mosaico comum do trigo. O longo período de sobrevivência do vetor do vírus no solo, dificulta o seu controle pela rotação de culturas. Algumas estratégias de controle químico e práticas culturais ainda precisam ser melhor exploradas para aumentar a eficiência de controle (LAU, 2017).

A utilização de tratamento de sementes é uma prática importante para redução de patógenos que infestam e infectam as sementes, além da proteção de patógenos que sobrevivem no solo quando é realizada a semeadura. A patologia de sementes objetiva verificar a qualidade sanitária das sementes, podendo direcionar o tratamento de sementes. A presença de patógenos contribuem para a redução do vigor e germinação, sendo que a semente pode ser veículo de disseminação e introdução (ou reintrodução) de patógenos (HENNING, 2005).

Atualmente no Brasil, a doença conhecida como mosaico comum do trigo ocorre principalmente na região sul, devido o favorecimento pelas condições climáticas, tais como: altas precipitações pluviométricas e temperaturas amenas, além da presença de compactação dos solos, que favorece maior período de água livre na superfície do solo. Esse patossistema é bastante complexo e influenciado por vários fatores, necessitando de mais estudos para o manejo dessa doença. Os objetivos do trabalho foram realizar a análise da qualidade fisiológica e a sanidade de sementes submetidas a diferentes tratamentos, como fungicidas, agentes de biocontrole e estimuladores, a caracterização do plasmodioforomiceto associado as raízes de plantas de trigo sintomáticas e avaliar o efeito do tratamento de sementes, visando o controle do vetor e conseqüentemente da virose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORIGEM, FENOLOGIA, IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E DOENÇAS DO TRIGO

O trigo pertence à família Poaceae (= Gramineae) Subfamília: Pooideae (= Festucoideae) Tribo: Triticeae Dumort. (= Hordeae) Subtribo: Triticinae Gênero: *Triticum*, Espécie: *Triticum aestivum* (L.) Thell. Há evidências que o trigo, seja originário de gramíneas silvestres que se desenvolviam nas proximidades dos rios Tigre e Eufrates (Ásia), por volta dos anos 10.000 a 15.000 a.C. Contudo, os primeiros registros encontrados datam do ano 550 a.C., o que leva a concluir que a maioria das características da planta são conhecidas há mais de 2.000 anos (SCHEEREN; CASTRO; CAIERÃO, 2015). O trigo chegou ao continente americano pelos colonizadores europeus. No Brasil atribui-se que a espécie foi introduzida pelas embarcações de Martim Afonso de Souza em 1534, na capitania de São Vicente (MORI, 2015).

O trigo apresenta características morfológicas muito semelhantes aos demais cereais de inverno que têm a mesma finalidade de produção de grãos (cevada, aveia, centeio e triticale). A planta de trigo é estruturada em raízes, colmo, folhas e inflorescência (SCHEEREN; CASTRO; CAIERÃO, 2015).

O sistema radicular do trigo apresenta três grupos de raízes: raízes seminais, raízes permanentes (coroa) e raízes adventícias. O desenvolvimento ocorre principalmente nas camadas superficiais, explorando entre 20 a 30 cm de profundidade do solo (RUGGIERI, 2011).

Nas folhas a primeira estrutura a ser emitida é denominada de coleóptilo (pseudofolha), que possui a função de proteger o desenvolvimento do mesocótilo, a região da coroa e a emissão da plúmula, que é a primeira folha. Cada folha é composta pela bainha, lâmina, lígula e um par de aurículas, normalmente pilosas, na base da lâmina. O colmo das plantas de trigo normalmente é oco, cilíndrico e com quatro a sete entrenós. Na fase de afilhamento (ou perfilhamento), aproximadamente 15 dias após a germinação das sementes, são emitidos novos colmos denominados de afilhos (ou perfilhos) envolvidos em estruturas foliares denominadas prófilos (normalmente inseridas nos nós da coroa). Quanto a inflorescência do trigo, apresenta uma espiga composta, dística, formada por espiguetas alternadas e opostas no ráquis. Cada espiguetas é constituída por flores (2 a 9) dispostas alternadamente e presas à ráquila.

Cada flor é protegida por duas estruturas denominadas lema e pálea, onde ocorre a formação dos grãos (SCHEEREN et al., 2015).

A área de cultivo mundial de trigo corresponde a cerca de 220 milhões de hectares, com uma produção de 744 milhões de toneladas. Os países maiores produtores mundiais de trigo são a China, Índia, Rússia, Estados Unidos e Canadá, sendo os maiores exportadores a Rússia, Estados Unidos, Canadá, Ucrânia e Austrália. Países como Egito, Indonésia, Argélia, Japão e o Brasil são os maiores importadores mundiais desse cereal (USDA, 2017).

A área semeada de trigo no Brasil na safra 2017 ficou próximo a 1,9 milhões de hectares (ha), com estimativa de produtividade de 2.215 kg/ha, estimando uma produção de 4,26 milhões de toneladas, ficando bem abaixo da safra 2016 onde foram colhidos 6,73 milhões de toneladas. A menor produção na safra 2017 foi devido a menor área semeada e a problemas climáticos que prejudicaram o rendimento da cultura. O principal estado produtor do Brasil é o Paraná, seguido do Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina (CONAB, 2018).

No estado do Paraná, na safra 2017, o início do desenvolvimento da cultura foi mais chuvoso, ocorrendo maiores problemas com doenças. A estimativa se consolidou em 2.308 kg/ha, 26,5% menor que a safra 2016. Apesar da redução na produtividade, a qualidade ficou dentro do padrão, devido ao tempo seco durante a colheita. No estado do Rio Grande do Sul, ocorreu dificuldade de semeadura devido ao excesso de chuvas e a posterior estiagem no período de estabelecimento da cultura. A produtividade reduziu 43,2% em relação à safra 2016, ficando em 1.826 kg/ha. A qualidade dos grãos colhidos foi comprometida em virtude do excesso de chuvas durante o período da colheita. No estado de Santa Catarina a produtividade média foi de 2.630 kg/ha, sendo 30,8% inferior à safra 2016 (CONAB, 2018).

O consumo nacional de trigo é de aproximadamente 11,3 milhões de toneladas, necessitando de importação. Para o ano de 2017 a importação ficou próxima a 7,2 milhões de toneladas, sendo o maior volume na última década. O principal fornecedor de trigo para o Brasil é a Argentina, seguido de Paraguai, Estados Unidos e Canadá (CONAB, 2017).

Na região sul, principal região produtora, a cultura é semeada de maio a julho, sendo o trigo uma das melhores opções de lucratividade para os produtores conforme zoneamento agroclimático de cada região. Na região central do Brasil, o cultivo pode ser classificado em sequeiro e irrigado. O sequeiro é semeado em fevereiro e março,

possui maior risco, pois o potencial de rendimento de grãos está associado a chuvas regulares em quantidade adequada durante o ciclo da cultura. O cultivo irrigado é semeado em abril e maio, sendo opção para realizar rotação de culturas nessas áreas. O rendimento de grãos é elevado, sendo um determinante importante na lucratividade da lavoura de trigo irrigado. No Brasil central, a irrigação é uma prática indispensável para permitir o cultivo na época de seca (COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 2017).

O trigo no Brasil é afetado por várias doenças. As condições climáticas, onde predominam temperaturas altas e precipitações pluviais frequentes, favorecem o desenvolvimento de inúmeras enfermidades. Essas podem ser responsáveis por danos elevados no rendimento e na qualidade dos grãos do trigo (PICININI; FERNANDES, 1995).

Os patógenos diferem em seus requerimentos térmicos. Muitos se desenvolvem melhor em áreas, estações ou anos com temperaturas mais baixas, e outros são favorecidos quando predominam temperaturas relativamente altas. A água influencia no estabelecimento e no desenvolvimento dos patógenos de muitas maneiras, desempenhando um papel importante como veículo de transporte na dispersão de muitos patógenos dentro da mesma planta ou de uma planta para outra, além de favorecer a infecção de patógenos que requerem período de molhamento (REIS, 2004).

As doenças bióticas do trigo podem ser classificadas em quatro grupos: (i) doenças causadas por fungos; (ii) doenças causadas por bactérias; (iii) doenças causadas por vírus; e (iv) doenças causadas por nematóides (MEHTA, 1978).

As principais doenças de ocorrência na cultura do trigo no Brasil são causadas por fungos, como: oídio (*Blumeria graminis* Speer f.sp. *tritici*), ferrugem da folha (*Puccinia triticina* Eriks), mancha amarela (*Drechslera tritici-repentis* Died), mancha marrom (*Bipolaris sorokiniana* Sacc. In Sorok), brusone (*Pyricularia oryzae* Cavara) e giberela (*Gibberella zeae* Schw). As doenças causadas por bactérias de maior importância, são a estria bacteriana (*Xanthomonas campestris* (Pam.) Dow pv. *undulosa* Hagb) e o halo bacteriano da aveia, agente causal *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Hall. As principais viroses, são o nanismo amarelo da cevada (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) e o mosaico comum (*Soil-borne wheat mosaic virus* - SBWMV e *Wheat spindle streak mosaic virus* – WSSMV) (LAU, 2014; REIS; CASA, 2007).

2.2 VIROSES EM TRIGO

Os vírus são nucleoproteínas compostas de ácido nucléico (RNA ou DNA) revestido por uma camada protetora, o capsídeo, sendo parasitas intracelulares obrigatórios. Utilizam os ribossomos e os aminoácidos da célula hospedeira para síntese de suas proteínas, além dos nucleotídeos e de certas enzimas do hospedeiro para síntese de novas cópias do ácido nucléico viral. A energia necessária para esse processo é proveniente da célula hospedeira (HULL, 2013). Os vírus não possuem organização celular, apenas uma estrutura molecular. Essencialmente, são moléculas de nucleoproteínas auto reproduzíveis e com capacidade de sofrer mutações. Essas duas características são típicas de seres vivos. Todavia, como não possuem organelas para lhes permitir a obtenção, armazenamento e utilização de energia, só conseguem subsistir no interior de células vivas, utilizando todos os componentes celulares do hospedeiro para completar o seu ciclo (HULL, 2013).

Os sintomas mais encontrados em doenças em plantas causadas por vírus são desvios de cor, deformações, sintomas de necrose, também as alterações em organelas, como o cloroplasto ou o núcleo, ou inclusões formadas por proteínas ou partículas virais que acumulam na célula (ZERBINI et al., 2002). Os sintomas induzidos por vírus de plantas podem ser divididos em sintomas morfológicos e citológicos, tendo em vista o nível ou local de observação, ou seja, se no órgão ou na célula da hospedeira (ZERBINI et al., 2002).

A transmissão dos vírus pode ocorrer via semente ou pólen, material propagativo, vetores (fungos, ácaros, nematoides, insetos) e mecanicamente. Os vírus têm capacidade de causar doenças em vários organismos, sendo agentes infectantes de células vivas em animais e plantas, além de outros organismos mais simples, como as bactérias (HULL, 2013).

Segundo Brunt et al. (1996) a cultura do trigo é suscetível a 55 espécies virais. No Brasil até o momento sete espécies virais foram identificadas no trigo, o Brazilian wheat spike virus (BWSpV) gênero *Tenuivirus* (CAETANO et al., 1971), *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) pertencentes à família *Luteoviridae*, gênero *Luteovirus*, *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) (CAETANO, 1972) família *Luteoviridae*, gênero *Polerovirus*, *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) família *Virgaviridae*, gênero *Furovirus* (CAETANO, 1982), *Brome mosaic virus* (BMV) (CAETANO et al., 1990) família *Bromoviridae*, gênero *Bromovirus*, *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV)

(CAETANO, 1998) família *Potyviridae*, gênero *Bymovirus* e *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) família *Potyviridae*, gênero *Tritimovirus* (MAR et al., 2013).

Segundo Lau (2014) as principais viroses que causam maiores prejuízos econômicos são: o nanismo amarelo, causado pelas espécies BYDV e CYDV, e o mosaico comum do trigo, atribuído principalmente ao SBWMV. Recentemente, foi detectado no país o mosaico estriado do trigo, causado por *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) sendo transmitido pelo ácaro do enrolamento do trigo *Aceria tosichella* (LAU, 2014). Os sintomas da infecção por WSMV consistem de pequenas lesões cloróticas nas folhas mais jovens, evoluem para estrias amarelas paralelas às nervuras das folhas, formando um padrão de estrias verdes e amarelas em linhas descontínuas. Os vírus BYDV e CYDV são transmitidos por algumas espécies de pulgões (Hemiptera, Aphididae), entre os sintomas mais característicos desta virose está a alteração da coloração do limbo foliar. No período de 2011 a 2013, Lau (2014) evidenciou que na média das cultivares avaliadas, essas apresentaram uma redução do potencial produtivo de aproximadamente 50%.

2.2.1 Mosaico comum do trigo

O *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1919 (MCKINNEY, 1923). Esse vírus de plantas apresenta partículas alongadas e rígidas, um RNA de fita simples com uma estrutura semelhante a tRNA na extremidade 3'. O gênero apresenta uma morfologia conforme descrição a seguir: as partículas apresentam simetria helicoidal, com cerca de 20 nm de diâmetro e com comprimentos predominantes de 140-160 nm e 260-300 nm; e apresentam genoma bipartido (RNA 1 com 6-7Kb e RNA 2 com 3,5-3,6 Kb). Os RNAs 1 e 2 codificam as proteínas responsáveis pela replicação, movimento e transmissão (ADAMS et al., 2012).

A espécie tipo do gênero *Furovirus*, SBWMV se destaca como o agente causal de uma das mais importantes viroses da cultura do trigo no Brasil juntamente com o nanismo amarelo, causado por BYDV e CYDV, sendo estas as principais viroses que afetam a cultura do trigo no Brasil (LAU, 2014).

O SBWMV é naturalmente transmitido por zoósporos do *Polymyxa graminis* Led. (CAETANO et al., 1971). Ocorre, principalmente, no planalto do Rio Grande do Sul e no Sul do Paraná, causando danos no rendimento de grãos. Lavouras inteiras

podem estar infectadas embora a ocorrência em reboleiras e/ou em linhas seja mais comum (REIS; CASA, 2007). Em adição ao SBWMV, tem sido encontrado o *Bymovirus* (WSSMV) em plantas de trigo apresentando sintomas de mosaico, sendo esse vírus também transmitido por *P. graminis* (CAETANO, 1998).

O mosaico comum reduz a produtividade nas regiões de inverno frio e úmido no estabelecimento da cultura, onde se cultiva trigo em áreas com a presença de inoculo, sendo as infecções mais evidentes após períodos úmidos entorno de 48 horas de água livre (CAETANO, 1982).

Em trigo, os sintomas induzidos pelo SBWMV variam do mosaico verde ao amarelo, ocorrendo mais facilmente em plantas cultivadas em áreas mais baixas e, conseqüentemente, mais úmidas. Dessa forma, em função do amarelecimento em reboleiras, as áreas com plantas infectadas são reconhecidas de uma certa distância, especialmente durante extensos períodos de frio e alta umidade, mas os sintomas tornam-se pouco visíveis quando ocorre a maturação das plantas ou quando há aumento da temperatura (NYKAZA; HEINE; NIBLETT, 1979). Em cultivares de trigo suscetíveis, nos quais a infecção inicia-se precocemente, verifica-se que as plantas são severamente atrofiadas e têm normalmente numerosos afilhos (SOUZA, 2005).

Ocorre dificuldade no controle do SBWMV, pois longo período de sobrevivência do vetor e a diversidade de plantas hospedeiras dificultam o controle desta virose de outra forma que não seja a resistência genética. No Brasil, a cultivar Embrapa 16 é resistente, sendo esta característica transmitida com eficiência à sua progênie (BARBOSA et al., 2001).

Embora existam poucas informações a respeito dos danos causados no Brasil, Dalbosco, Schons e Prestes (2002) relataram uma redução de até 61% (variando de 7 a 61%) no peso de grãos em plantas sintomáticas de trigo. A incidência do mosaico comum nas cultivares BR 23, OR 1, IAC 5 – Maringá, Embrapa 27, BR 32, Embrapa 120 e Embrapa 16, variam de 27,5% a 100% no estágio de emborrachamento. Na região Sul do Brasil, ao longo dos últimos anos, tem sido observado um aumento na extensão das áreas tritícolas que exibem sintomas de mosaico comum (DALBOSCO; SCHONS; PRESTES, 2002).

A detecção de viroses pode ser feita por métodos biológicos, sorológicos e moleculares. Os testes biológicos, que envolvem a transmissão do patógeno para plantas hospedeiras adequadas, são os únicos meios de diagnóstico que permitem avaliar a infectividade viral. Os testes biológicos mais utilizados são aqueles baseados

em inoculação mecânica, união de tecidos (enxertia) e transmissão por organismos vetores (AGRIOS, 2005).

A sorologia apresenta diversas técnicas para detecção viral que se caracterizam pelo emprego de anticorpos específicos capazes de reconhecer proteínas capsidiais do vírus. Os métodos moleculares são aqueles baseados na detecção do ácido nucleico pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Neste método, pelo menos uma parte da sequência do genoma a ser detectado precisa ser conhecida para dar origem aos oligonucleotídeos que serão utilizados na reação.

A detecção do vírus SBWMV no Brasil foi baseada inicialmente pela sintomatologia nas plantas infectadas artificialmente ou naturalmente, confirmando as similaridades nas propriedades biológicas e estudos da morfologia do vírus realizada por microscopia eletrônica (CAETANO; KITAJIMA; COSTA, 1978).

Até recentemente não haviam sequências de nucleotídeos disponíveis dos vírus que causam o mosaico comum do trigo no Brasil e testes sorológicos e moleculares, com base em informações de vírus oriundos de outros países, têm sido inconclusivos (LAU et al., 2017). Diante desse cenário, o grupo de pesquisa composto por pesquisadores da BIOTRIGO Genética, Embrapa e UDESC realizaram um trabalho de identificação do(s) vírus associado(s) ao mosaico por meio do sequenciamento de nova geração, com o objetivo de caracterizar molecularmente a espécie viral associada a plantas de trigo apresentando sintomas de mosaico. Os resultados indicam que as plantas que apresentavam sintomas de mosaico analisadas, estão infectadas por uma nova espécie viral pertencente a família *Benyviridae*.

2.2.2 Família *Benyviridae*

Essa família apresenta como característica distinta vírus multipartidos em forma de bastonete rígido, contendo genomas de RNA de fita simples sentido positivo com as extremidades 5' m⁷G cap e 3' polyA e clivagem pós-tradução da replicase viral. Esta família apresenta um único gênero, *Benyvirus*. O gênero apresenta uma morfologia conforme descrição a seguir: as partículas apresentam simetria helicoidal, com cerca de 20 nm de diâmetro e com comprimentos predominantes de 140-160 nm e 260-300 nm; As espécies que apresentam genoma bipartido (RNA 1 com 6-7Kb e RNA 2 com 3,5-3,6 Kb), os RNAs 1 e 2 codificam as proteínas responsáveis pela

replicação, movimento e transmissão (GILMER; RATTI, 2017). As proteínas da capa (revestimento do vírus) constituem cerca de 95% do peso das partículas (KOENIG; LESEMANN, 2005).

Atualmente, o gênero *Benyvirus* compreende as espécies *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV, 5 componentes genômicos), *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV, 4 componentes genômicos), *Burdock mottle virus* (BdMV, genoma bipartido) e *Rice stripe necrosis virus* (RSNV, genoma bipartido) e duas espécies tentativas *Mangifera indica latent virus* (MILV, genoma bipartido) e *Hubei Beny-like virus 1* (HBBLV, um único componente genômico caracterizado) (GILMER; RATTI, 2017).

O vírus *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV) é a espécie tipo do gênero *Benyvirus*, e em conjunto com o vírus *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), são conhecidos como os agentes causadores da doença conhecida como “rizomania”. O BNYVV tem distribuição mundial em quase todas as áreas de produção de beterraba, já o BSBMV se restringe aos Estados Unidos, ambos têm como vetor o plasmodioforomiceto *Polymyxa betae* (KOENIG; LESEMANN, 2005).

Na ocorrência da “rizomania” o sistema radicular fica com aspecto de cabeleira e a ponta da raiz necrosada. Internamente, os anéis da raiz apresentam necrose. Nas folhas nem sempre o sintoma é verificado devido à latência do vírus, mas quando se apresenta as folhas ficam cloróticas e as nervuras com lesões amarelo brilhantes e o limbo foliar verde claro (MARCUIZZO, 2016).

O vírus *Rice stripe necrosis virus* (RSNV) ocorre na Costa do Marfim na África, na América do Sul e Central (MORALES et al., 1999). No Brasil foi relatado na safra agrícola 2001/02, em lavouras de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado, localizadas no Rio Grande do Sul. O RSNV também pertence ao gênero *Benyvirus* sendo transmitido por *P. graminis* Led. (MACIEL et al., 2006).

2.2.3 Vetor

Em 1939, Ledingham no Canadá encontrou uma espécie de plasmodioforomiceto que parasita raízes de trigo, denominada *P. graminis* (LEDINGHAM, 1939).

Os esporos de repouso presentes no solo, em condições favoráveis são induzidos a formar zoósporos primários biflagelados, os quais possuem capacidade de deslocamento em condições de alta umidade do solo. Ao atingir os pêlos

radiculares de plantas hospedeiras, ficam encistados dentro da célula hospedeira, passam por divisões nucleares mitóticas e desenvolvem uma estrutura multinucleada chamada de plasmódio. À medida que cresce nos pelos radiculares os plasmódios aumentam em tamanho, transformando-se em zoosporângio. Os zoosporângios primários formam pequenos tubos de saída que liberam zoósporos secundários, esses podem penetrar no córtex dos hospedeiros novamente e realizar mais um ciclo, ou formar estrutura de repouso na raiz ou liberar no solo (LITTLEFIELD et al., 1998).

Essa espécie não é considerada um patógeno de planta, mas representa uma ameaça significativa para a agricultura devido à sua capacidade de transmissão de vírus de importância agrônômica. Esse vetor é responsável pela transmissão de vírus de espécies distintas, pertencentes as famílias *Virgaviridae*, gêneros *Furovirus* e *Pecluvirus*, *Potyviridae* gênero *Bymovirus*, *Benyviridae* gênero *Benyvirus* (GILMER; RATTI, 2017). O vetor *P. graminis* foi detectado nas raízes da cultura de trigo, cevada, arroz, aveia, centeio, sorgo, milho, grama bermuda, bem como em diversas gramíneas temperadas (KANYUKA; WARD; ADAMS, 2003).

A temperatura ótima para o desenvolvimento do vetor é de 18 °C. A infecção pelo vírus é bem-sucedida quando a temperatura está em torno de 15 a 18 °C, e os sintomas nas plantas são mais visíveis quando a temperatura é inferior a 20 °C (CHEN; WILSON, 1995).

Segundo Cadle-Davidson et al. (2006) os esporos de repouso do vetor podem permanecer 10 anos no solo. Quando as condições são favoráveis e o hospedeiro é suscetível, após a semeadura o vetor infecta as raízes de trigo e as partículas virais do vírus associado ao mosaico podem ser liberadas dentro das células.

Como e quando *P. graminis* adquire o vírus e como os vírus entram no citoplasma das células da planta hospedeira ainda é desconhecido. No entanto, é provável que esses processos estão ocorrendo quando os zoósporos penetram as células e transferem seus conteúdos para o citoplasma da célula hospedeira. Quando isolados virulíferos de *P. graminis* cresceram em raízes de plantas hospedeiras resistentes ao vírus, os zoósporos liberados não continham ou transmitiam o vírus por muito tempo. Em trigo, é provável que a resistência à doença aconteça nas raízes restringindo a multiplicação do vírus ou transporte do vírus pelo sistema vascular das raízes para as folhas (KANYUKA; WARD; ADAMS, 2003).

O *P. graminis* é considerado parasita obrigatório e só pode ser mantido nas raízes das plantas hospedeiras. Portanto, é geralmente difícil obter DNA de boa

qualidade para estudos moleculares isentos do DNA contaminante da planta hospedeira ou de outros parasitas de raízes, especialmente quando amostras são coletadas no campo. Além disso, mesmo em condições experimentais de estufa, a multiplicação é lenta, levando de 3 a 4 semanas para produzir zoósporos e aproximadamente 2 a 3 meses para produzir esporos de repouso (ADAMS; SWABY; MACFARLANE, 1986).

Para realizar a caracterização molecular de *P. graminis* utiliza-se oligonucleotídeos específicos para o DNA ribossomal (*Internal Transcribed Spacer - ITS*). Essa região é conservada, variando dentro e entre populações (WARD e ADAMS, 1998). Estudos com esse vetor verificaram variação entre isolados em características de genoma, requerimento de temperatura, propondo dividir a espécie em grupos específicos (LEGREVE; DELFOSSE; MARAITE, 2002).

Dentre as medidas de controle do vetor, destaca-se o revestimento de sementes de trigo com fungicidas antes da semeadura, podendo auxiliar no controle do mosaico comum. Produtos químicos (metilbrometo ou formaldeído) podem diminuir a incidência da virose, mas são ecologicamente impraticáveis para o controle no campo em larga escala (CHEN; WILSON, 1995). Segundo Wesp et al. (2012) o tratamento de sementes com fungicidas químicos e agentes biológicos apresentam efeito na redução de incidência do mosaico comum, sendo assim podem se constituir em ferramenta no controle do vetor e redução da incidência da virose no campo.

2.2.4 Tratamento de sementes na cultura do trigo

O tratamento de sementes compreende a aplicação de processos e substâncias que preservem ou aperfeiçoam o desempenho das sementes, permitindo que as culturas expressem o seu potencial genético. Com este objetivo, diversos produtos podem ser utilizados, tais como, agroquímicos (fungicidas e inseticidas), produtos biológicos, inoculantes, estimulantes e micronutrientes (MENTEN; MORAES, 2010).

Tratamento químico de sementes refere-se à aplicação de produtos fitossanitários às sementes. O seu princípio baseia-se na existência de produtos eficientes contra os alvos que deseja atingir. É um método bastante diversificado, que se encontra em expansão e aprimoramento constante, apresenta valor comercial e cada vez é mais utilizado no Brasil e no mundo (HENNING et al., 2005).

Além do controle exercido sobre os patógenos transmitidos pelas sementes, alguns produtos químicos possuem ação residual, protegendo as sementes e as plântulas contra a infecção de microrganismos, insetos do solo e deterioração durante o armazenamento. Isto é relevante, principalmente, quando as condições externas estiverem desfavoráveis à germinação e crescimento das plantas (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977).

O tratamento de sementes de trigo é essencial, tendo em vista a redução de inóculo de patógenos que são vinculados às sementes (REIS; CASA, 2007). Em muitos casos, apesar de não apresentar sintomatologia externa, as sementes podem estar infectadas por patógenos, que podem aparecer no desenvolvimento da cultura em estágios mais avançados (DHINGRA, 2005). Da mesma forma, o uso de sementes de alta qualidade, tanto fisiológica quanto sanitária, pode favorecer a obtenção de estande adequado e plântulas vigorosas, o que poderá incrementar o rendimento de grãos (LIMA; MEDINA; FANAN, 2006).

A prática de tratamento sementes visando o controle do *P. graminis* deve ser melhor explorada. Em trabalho realizado por Wesp et al. (2012), utilizando tratamentos de sementes em trigo visando amenizar e/ou retardar a infecção do vetor nas raízes, observou-se menores incidências do mosaico com sementes tratadas com azoxistrobina (45 gr i.a./100 Kg de sementes), triadimenol (40,5 g i.a./100 Kg de sementes) e piraclostrobina (45 g i.a./100 Kg de sementes).

3 CAPÍTULO 1 TESTES FISIOLÓGICOS E QUANTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS INFECTANDO SEMENTES DE TRIGO SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS

3.1 RESUMO

O tratamento de sementes com algumas moléculas pode apresentar efeito de fitotoxicidade para as plântulas de trigo, prejudicando o desenvolvimento inicial da cultura. A presença de patógenos associados à semente pode causar deterioração levando ao decréscimo na germinação de semente, subdesenvolvimento e até morte de plântulas. O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar fungos infectando sementes de duas cultivares de trigo submetidas a diferentes tratamentos de sementes, e posteriormente submetê-las a testes fisiológicos. O trabalho de patologia de sementes foi realizado no Laboratório de Fitopatologia, e os testes fisiológicos no Laboratório de Análise de Sementes, na Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, na safra 2017. Foram analisados duas cultivares de sementes de trigo (BRS Guamirim e TBIO Toruk) com treze tratamentos de sementes. Para cada tratamento foram analisadas 400 sementes, em um delineamento experimental completamente casualizado com quatro repetições. Para a patologia de sementes as mesmas foram submetidas ao teste de sanidade em meio de BDA (Batata-Dextrose-Ágar). As sementes foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com regime de luz de 12 horas. Foram consideradas infectadas as sementes na qual foi possível identificar a colônia e/ou estruturas dos fungos. As incidências médias dos principais fungos detectados em sementes no tratamento controle foram: *Alternaria* spp. (34,8%), *Aspergillus* spp. (19,9%), *Drechslera* spp. (4,0%), para a cultivar TBIO Toruk; e *Alternaria* spp. (28,4%), *Aspergillus* sp (19,3%), *Drechslera* spp. (5,9%) para cultivar BRS Guamirim. Para o teste de germinação foi utilizado folhas de papel toalha “germitest”, os rolos foram acondicionados em germinador por 8 dias em temperatura de 20°C e posteriormente as plântulas foram classificadas como normais ou anormais. Para a cultivar TBIO Toruk a testemunha diferiu do tratamento azoxistrobina e *Bacillus amyloliquefaciens*, para cultivar BRS Guamirim não houve diferença. No teste de envelhecimento acelerado as sementes foram acondicionadas em caixas plásticas com umidade relativa de 100%. O período de permanência das amostras no interior da câmara a 42°C , foi de 48 horas, seguindo-se a condução de teste de germinação em rolos de papel-toalha, a 20°C . Para as porcentagens de plântulas normais houve diferença entre os tratamentos testados, sendo o tratamento testemunha, tiofanato metílico + fluazinam, piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil e Carboxamida A os que apresentaram os maiores índices de vigor, enquanto os tratamentos metalaxil e dimetomorfe apresentaram os menores índices de vigor.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*. Sanidade de sementes. Germinação. Vigor.

3.2 INTRODUÇÃO

Os testes de sanidade têm como objetivo determinar a condição sanitária da amostra de sementes e, por inferência, a qualidade do lote (HENING, 2005). Segundo Reis e Casa (1998), a erradicação de patógenos em sementes é uma tarefa difícil. Por isso, poucos avanços ou sucessos foram obtidos e, portanto, publicados. Algumas dificuldades podem ser atribuídas à associação íntima do patógeno com o hospedeiro.

O tratamento químico é o método mais comum de se tratar sementes. O seu princípio baseia-se na existência de produtos eficientes contra o(s) patógeno(s), que apresentem baixa fitotoxicidade e sejam pouco tóxicos ao homem e ao ambiente (MENTEN, 1991).

O objetivo do tratamento de sementes com fungicidas é eliminar os fungos veiculados a essa fonte de inóculo, evitando seu retorno aos órgãos aéreos, pelo processo de transmissão na lavoura recém-estabelecida. A eficiência está relacionada à incidência dos fungos em sementes, fungitoxicidade, dose e qualidade da cobertura da semente pelo fungicida, na tomada de decisão para tratar as sementes com fungicida, recomenda-se sua análise sanitária. Os produtos indicados para o tratamento de sementes de trigo e triticales são Carboxina + tiram, Tiram, Difenconazol, Flutriafol e Triadimenol (CUNHA; CAIERÃO; ROSA, 2015), esses fungicidas são indicados para controle de *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*, *Stagonospora nodorum* e *Fusarium graminearum*, o tratamento de sementes com inseticidas imidacloprida e tiametoxam é indicado para controle de pulgões afim de evitar a transmissão de vírus do nanismo amarelo da cevada (VNAC) (REIS; ZOLDAN; GERMANO, 2016)

Os danos causados por microrganismos transmitidos pelas sementes dependem do patógeno que está associado, da fonte de inóculo, da espécie vegetal cultivada e das condições climáticas no período do desenvolvimento da cultura (LUCCA FILHO, 2006).

É importante conhecer o percentual de ocorrência de um patógeno e a localização deste em relação à semente. Esse tipo de informação permite determinar métodos de detecção e de tratamento de sementes e, também estimar o modelo de desenvolvimento das doenças no campo (COLHOUN, 1983).

De acordo com Marcos Filho (1999) vigor é o conjunto de atributos que confere à semente a capacidade para germinar, emergir e resultar rapidamente em plântulas

normais, sob ampla diversidade de condições ambientais, atributos esses não demonstrados pelo teste de germinação. A análise sanitária mostra quais os patógenos associados a semente e sua incidência, orientando o tratamento de sementes. Aproximadamente, 90% das culturas utilizadas para a alimentação, tanto humana como animal, são propagadas por sementes (HENNING, 2005) e o inóculo presente nelas poderá resultar em aumento das doenças no campo, além de sua introdução em áreas livres de patógenos.

A germinação das sementes pode sofrer alterações por fatores internos, relacionados à longevidade, vigor e também por fatores externos, como água, temperatura e oxigênio (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Resultados de pesquisas têm evidenciado que alguns produtos, quando aplicados às sementes, podem, em determinadas situações, ocasionar redução na germinação destas e na sobrevivência das plântulas, devido ao efeito de fitointoxicação (NASCIMENTO et al., 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar efeito de fitotoxicidade dos produtos testados visando o manejo do mosaico, nas sementes de trigo das duas cultivares (TBIO Toruk e BRS Guamirim) submetidas a diferentes tratamentos. E consequentemente identificar e quantificar fungos infectando as sementes, além de avaliar a germinação e vigor das sementes.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em junho de 2017 no Laboratório de Fitopatologia e Laboratório de Análise de Sementes do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, em Lages, Santa Catarina.

3.3.1 Tratamento de sementes

Foram efetuados os tratamentos de sementes de duas cultivares de trigo, sendo TBIO Toruk (Biotrigo Genética) BRS Guamirim (Embrapa Trigo). As sementes foram tratadas em sacos plásticos, adicionando-se os produtos em (g ou mL de i.a./100kg de sementes) em um volume de calda de produto + água destilada + polímero na concentração de 2%. As sementes foram agitadas manualmente até a cobertura das mesmas. No tratamento testemunha, foi utilizado apenas água destilada

+ polímero. Após tratadas as sementes foram secas à sombra por 48 horas. Na escolha dos produtos utilizados para os tratamentos das sementes, o objetivo foi explorar diversas moléculas de fungicidas isoladas e em mistura, com diferentes grupos químicos e mecanismos de ação, diferentes espécies de agentes de biocontrole, além de indutor de resistência. As suas formulações, concentrações e doses utilizadas estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Produtos utilizados para tratamento das sementes de trigo (Lages, SC, 2017).

Tratamentos	Ingredientes Ativos - Concentração (g/L ou Kg)	Dose*
T1	Testemunha	
T2	<i>Bacillus subtilis</i> 13,68 g/L	10
T3	<i>Trichoderma asperellum</i> (mínimo 1×10^{10} UFC/g) 28%	100
T4	Acibenzolar-S- Metílico 500 g/kg	25
T5	Azoxistrobina 250 g/L	200
T6	Piraclostrobina 25g/L + Tiofanato Metílico 225g/L+ Fipronil 250 g/L	200
T7	Tiofanato Metílico 350 g/L + Fluazinam 52,5 g/L	200
T8	Fenamidona 500 g/L	200
T9	Fludioxonil 37,5 g/L + Metalaxil- M 30 g/L + Tiabendazole 300 g/L + Azoxistrobina 15 g/L	100
T10	Carboxamida A 330 g/L	45
T11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (2×10^{10} UFC/g)	10
T12	Metalaxyl 350 g/L	5,72
T13	Dimetomorfe 500 g/Kg	80

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Nota: * mL ou g de produto comercial / 100 kg de semente. Em todos os tratamentos foi adicionado polímero da empresa Incotec na dose de 200 mL/100kg de sementes.

3.3.2 Testes de germinação e vigor

Os testes fisiológicos seguiram conforme descritos nas Regras de Análise de Sementes (RAS) utilizando quatro repetições de 100 sementes por tratamento para ambos os testes.

Para o teste de germinação foram utilizadas folhas de papel toalha “germitest”, sendo as folhas de papel umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa das mesmas, onde foram distribuídas as sementes e cobertas com mais uma folha de papel e enroladas. Os rolos foram acondicionados em germinador

por 8 dias em temperatura de 20°C, posteriormente as plântulas foram classificadas como normais ou anormais.

No teste de envelhecimento acelerado foram utilizadas caixas plásticas (11x11x3 cm). A umidade relativa no interior dessas caixas foi obtida pela adição de 40 mL de água (para obtenção de, aproximadamente, 100% U.R.). As amostras foram distribuídas na superfície da tela metálica mantida no interior de cada caixa plástica. O período de permanência das amostras no interior da câmara a 42° C foi de 48 horas, seguindo-se a condução de teste de germinação em rolos de papel-toalha, a 20° C (BRASIL, 2009). Foram computadas as percentagens de plântulas normais para cada uma das repetições de cada tratamento.

Foi utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância, utilizando o pacote estatístico ExpDes.pt, Ferreira, Cavalcanti e Nogueira, 2013, implementado no software R versão 3.4.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Os valores de F para os efeitos principais e as interações foram considerados significativos ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Quando alcançada significância realizou-se o teste de comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.3.3 Teste de patologia de sementes

Na patologia foram analisadas as sementes tratadas com fungicidas e indutor de resistência, além do tratamento controle para cada cultivar, sendo essas sementes desinfestadas. Para esse teste as sementes tratadas com agentes de biocontrole não foram consideradas, devido ao crescimento desses agentes, não sendo possível identificar as colônias dos patógenos. Para cada tratamento foram utilizadas 400 sementes, distribuídas em placas de Petri contendo meio de BDA (Batata-Dextrose-Ágar). As sementes foram incubadas a 25°C \pm 2°C e com regime de luz de 12 horas. Posteriormente, com o auxílio de lupa estereoscópica e microscópio ótico foi identificado e quantificada a presença dos patógenos. Foram consideradas infectadas as sementes na qual foi possível identificar a colônia e/ou estruturas dos fungos.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância, utilizando o pacote estatístico ExpDes.pt, Ferreira, Cavalcanti e Nogueira,

2013, implementado no software R versão 3.4.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), sendo os dados transformados em arco seno. Os valores de F para os efeitos principais e as interações foram considerados significativos ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Quando alcançada significância, realizou-se o teste de comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Testes de germinação e vigor

No teste de germinação em rolo de papel (Tabela 2), os tratamentos apresentaram desempenho satisfatório (acima de 80%) (BRASIL, 2009). Não houve diferença significativa para a germinação entre os tratamentos testados na cultivar BRS Guamirim. Para germinação da cultivar TBIO Toruk o tratamento testemunha apresentou (94,5%), diferindo dos tratamentos azoxistrobina (86,7%) e *Bacillus amyloliquefaciens* (87,5%). Segundo Dhingra, Muchovej e Cruz Filho (1980), alguns fungicidas podem diminuir a germinação de plântulas normais. Ao analisar a cultivar de trigo Pampeano e Quartzo, Hossen et al. (2014), verificaram que não houve diferença significativa entre o tratamento controle, carboxina + thiram, tiametoxam + carboxina + thiram, para o percentual de germinação.

Para o teste de envelhecimento acelerado, onde se estima o vigor das sementes, as mesmas são submetidas a uma condição de estresse. Constatou-se redução da porcentagem de germinação das sementes envelhecidas artificialmente, quando comparada ao teste de germinação convencional (Tabela 2). O teste apresentou diferença entre os tratamentos testados. Para a cultivar TBIO Toruk os índices de vigor dos tratamentos: tiofanato metílico + fluazinam, piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, Carboxamida A e tratamento controle, apresentaram índices superiores não diferindo estatisticamente, enquanto os tratamentos: *Bacillus amyloliquefaciens*, metalaxil e dimetomorfe reduziram o vigor das sementes. Para BRS Guamirim os tratamentos testemunha, *Bacillus subtilis*, acibenzolar-s-metílico, piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, tiofanato metílico + fluazinam, fludioxonil + metalaxil-m + tiabendazole + azoxistrobina e carboxamida A não diferiram, apresentando alto vigor.

No trabalho de Hossen et al. (2014) foi observado para o teste de envelhecimento acelerado, que o melhor tratamento foi o tiametoxam + carboxina + thiram, quando comparado com a testemunha sem aplicação, não diferindo, do tiametoxam + thiram, para as cultivares Quartzo e Pampeano. Neste trabalho, o tratamento piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil apresentou altos índices de germinação e vigor. Ao realizar tratamento de sementes na cultura da soja com piraclostrobina, pertencente a classe das estrobilurinas, Balardin et al. (2011), observaram melhoria de parâmetros fisiológicos com essa molécula. Fungicidas à base de estrobilurinas afetam as variáveis fisiológicas e bioquímicas das culturas. Em trabalhos realizados com trigo a aplicação de estrobilurina ocasionou incremento da retenção foliar da planta e aumento na produtividade de grãos (BRYSON; LEANDRO; JONES, 2000). Em pesquisa com trigo, Beck, Oerke e Dehne (2002), avaliaram que a aplicação de estrobilurinas reduziu a respiração e a senescência das folhas. Esses autores também verificaram a ativação do metabolismo de nitrogênio e um aumento da tolerância a fatores de estresse abióticos. Também pôde-se observar uma maior atividade fotossintética das plantas tratadas com estrobilurina em condições de campo, sendo que o benefício do rendimento do trigo dos tratamentos com estrobilurina variou de 2% a 9%.

Tabela 2 - Porcentagem de germinação e envelhecimento acelerado de sementes de trigo das cultivares TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicida, indutor de resistência e agentes de biocontrole em tratamentos de sementes (Lages, SC, 2017).

Tratamentos	Germinação (%)		Envelhecimento acelerado (%)	
	TBIO Toruk	BRS Guamirim	TBIO Toruk	BRS Guamirim
Testemunha sem aplicação	94,5 a	91,5 ns	84,0 ab	87,5 abc
<i>Bacillus subtilis</i>	90,7 ab	92,2	63,7 def	91,0 abc
<i>Trichoderma asperellum</i>	91,2 ab	94,2	73,2 bcd	84,0 bc
Acibenzolar-S- Metílico	88,7 ab	89,7	63,7 def	85,7 abc
Azoxistrobina	86,7 b	90,5	73,2 dcd	74,2 d
Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil	92,2 ab	95,0	88,5 a	90,5 abc
Tiofanato Metílico + Fluazinam	91,0 ab	93,0	87,7 a	95,2 a
Fenamidona	87,7 ab	93,5	76,2 bc	84,2 bc
Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina	90,5 ab	93,2	68,5 cde	90,7 abc
Carboxamida A	88,7 ab	95,7	79,2 abc	93,2 ab
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	87,5 b	89,7	61,7 ef	85,5 bc
Metalaxyl	91,2 ab	94,2	56,0 fg	83,7 bcd
Dimetomorfe	88,2 ab	91,5	49,5 g	83,2 cd
CV (%)	3,0	2,7	6,0	4,5

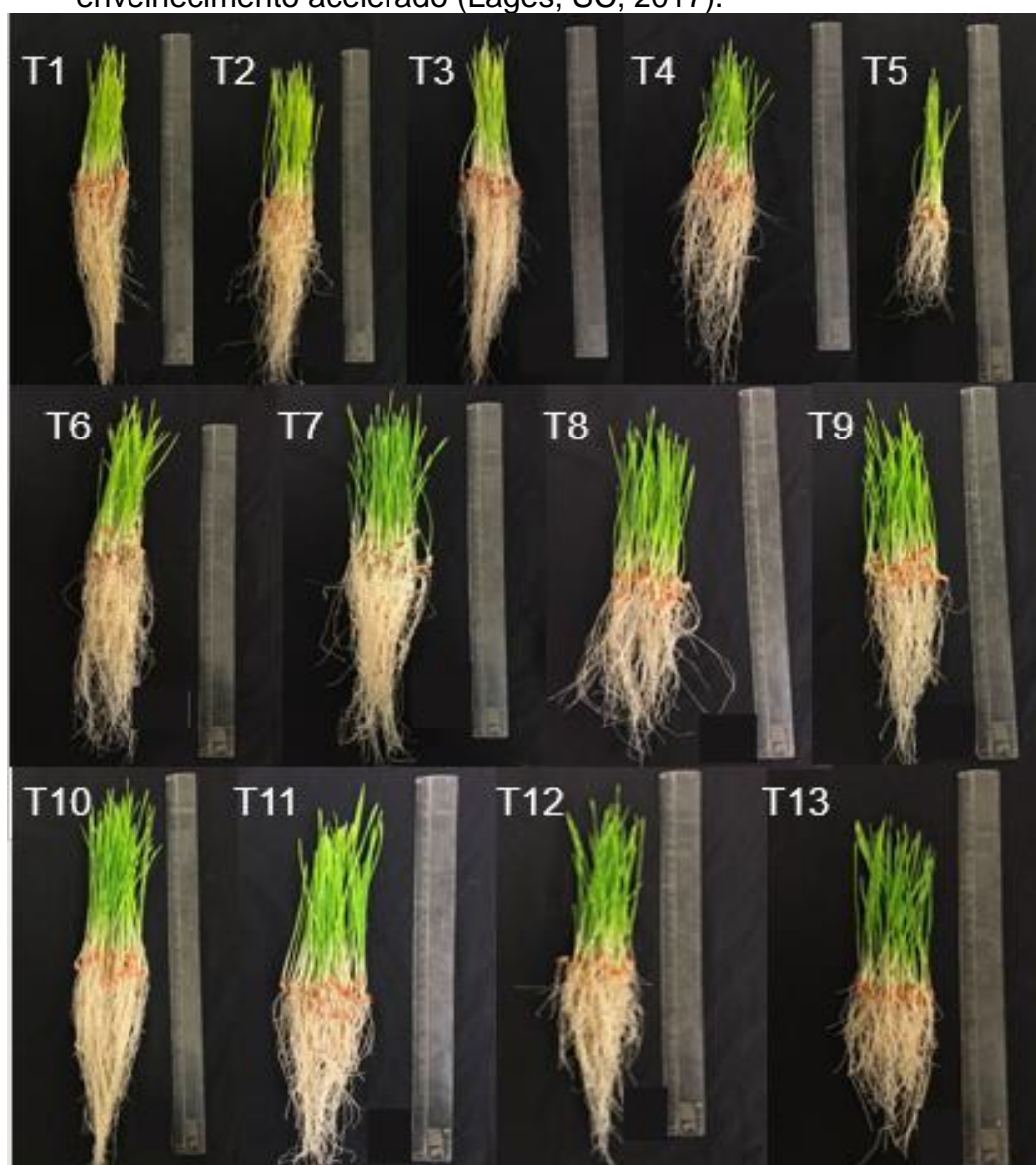
Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Nota: ns: não significativo. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%

No teste de vigor, quando unidas as plântulas normais dos respectivos tratamentos podem-se observar diferenças de comprimento de parte aérea e raiz de trigo (Figura 1). Os tratamentos utilizando agentes de biocontrole (T2, T3 e T11) e os fungicidas (T6 e T7), foram semelhantes a testemunha (T1); já o tratamento azoxistrobina (T5) apresentou redução no desenvolvimento das plântulas. Isso pode ter ocorrido devido a fitotoxicidade. Teste de comprimento de plântulas é um dos mais indicado para a detecção desse problema, podendo apresentar baixo percentual de emergência de plântulas (NETO; HENNING; YORINORI, 2000). Embora muitos trabalhos indiquem o efeito positivo de estrobilurinas sobre parâmetros fisiológicos e de desenvolvimento (como descrito anteriormente), observa-se aqui um efeito negativo na fase inicial de desenvolvimento da plântula para azoxistrobina (T5). O tratamento (T6 e T9) também contém em sua mistura molécula que pertence ao grupo

das estrobilurinas, porém com menor concentração, não sendo observado efeito de redução de parte aérea e raiz. Também é possível observar que o tratamento utilizando estrobilurina isolada (T5), foi o único que resultou em redução da parte aérea e da raiz, isso se deve, provavelmente, a maior dose utilizada nesse tratamento em comparação com as misturas contendo estrobilurinas (Figura 1).

Figura 1 - Plântulas de trigo da cultivar BRS Guamirim apresentando redução de parte aérea e raiz nos diferentes tratamentos de sementes do teste de envelhecimento acelerado (Lages, SC, 2017).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Nota: T1: Testemunha, T2: *Bacillus subtilis*, T3: *Trichoderma asperellum*, T4: Acibenzolar -S- Metílico, T5: Azoxistrobina, T6: Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil, T7: Tiofanato Metílico + Fluazinam, T8: Fenamidona, T9: Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina, T10: Carboxamida A, T11: *Bacillus amyloliquefaciens*, T12: Metalaxyl, T13: Dimetomorfe.

3.4.2 Patologia de sementes

Para as cultivares analisadas os patógenos *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. e *Drechslera* spp. apresentaram as maiores porcentagens de incidências (Tabelas 3 e 4). Demais patógenos encontrados, como o gênero *Penicillium* e *Fusarium*, apresentaram incidência inferior a 1%. O tratamento fenamidona que pertence ao grupo químico Imidazolinona não diferiu da testemunha para *Alternaria* spp., nas duas cultivares (Tabela 3 e 4). Para a cultivar TBIO Toruk (Tabela 3) o tratamento Carboxamida A apresentou uma redução significativa na incidência de *Alternaria* spp. e *Drechslera* spp. Essa molécula pertence ao grupo das carboxamidas e deve ser melhor explorada para essa finalidade. Para controle de *Alternaria* spp. e *Drechslera* spp., o fungicida iprodiona é o mais utilizado apresentando um nível de controle satisfatório (REIS & CASA, 2012). O tratamento acibenzolar-s-metílico reduziu a incidência de *Alternaria* spp. e *Drechslera* spp. diferindo estatisticamente, porém para *Aspergillus* spp. apresentou incidência maior que a testemunha na cultivar TBIO Toruk; já para a cultivar BRS Guamirim não houve diferença para *Alternaria* spp. e *Drechslera* spp., apresentando maior incidência de *Aspergillus* spp. que a testemunha (Tabelas 3 e 4). Para BRS Guamirim o tratamento dimetomorfe que pertence ao grupo químico da morfolina e metalaxil do grupo ditiocarbamato não apresentaram diferença estatística para os patógenos testados (Tabela 4). O tratamento tiofanato metílico + fluazinam reduziu significativamente a incidência dos fungos encontrados na patologia de sementes quando comparado aos demais tratamentos na cultivar BRS Guamirim (Tabela 4). Dados semelhantes foram encontrados por Soldatelli et al. (2017) em ensaio com controle de *Alternaria* spp. via tratamento de sementes com alguns fungicidas em sementes de feijão. Nesse trabalho o tratamento tiofanato metílico + fluazinam obteve redução da incidência de 22% observada na testemunha para 1% na cultivar BRS Estilo.

Tabela 3 - Incidência de fungos em cultivar de trigo TBIO Toruk, em função da aplicação de fungicidas e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Lages, SC, 2017).

Tratamentos	Incidência (%) TBIO Toruk		
	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Drechslera</i> spp.
Testemunha	34,8 a	20,0 b	4 a
Acibenzolar-S- Metílico	21,1 bcd	26,6 a	0,2 b
Azoxistrobina	25,9 b	19,7 b	0,2 b
Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil	23,8 bc	0 d	0,2 b
Tiofanato Metílico + Fluazinam	10,6 ef	0 d	0,5 b
Fenamidona	34,9 a	9,8 c	1 b
Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina	21,5 bcd	2,8 d	0,2 b
Carboxamida A	8,9 f	6,1 cd	0 b
Metalaxyl	19,5 cd	28,0 a	0,7 b
Dimetomorfe	16,1 de	29,0 a	0,2 b
CV (%)	10,6	42,4	19,0

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Nota: Dados transformados em arco seno. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 4 - Incidência de fungos em cultivar de trigo BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Lages, SC, 2017).

Tratamentos	Incidência (%) BRS Guamirim		
	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Drechslera</i> spp.
Testemunha	28,4 a	19,3 b	6,0 ns
Acibenzolar-S- Metílico	29,1 a	29,0 a	0
Azoxistrobina	25,1 a	8,3 c	0
Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil	24,4 a	4,3 cd	0
Tiofanato Metílico + Fluazinam	8,6 c	0 d	1,4
Fenamidona	32,2 a	2,9 cd	0
Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina	16,1 b	0 d	0
Carboxamida A	25,8 a	15,6 b	2,9
Metalaxyl	29,5 a	19,9 b	5,4
Dimetomorfe	29,3 a	29,5 a	5,4
CV (%)	11,8	22,7	46,8

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Nota: Dados transformados em arco seno. ns: não significativo. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

3.5 CONCLUSÕES

As doses utilizadas apresentaram resultados satisfatórios para germinação, os tratamentos azoxistrobina e *Bacillus amyloliquefaciens* reduziram a germinação para a cultivar TBIO Toruk em comparação a testemunha, mas ficaram acima dos 80%, parâmetro de comercialização para semente. Maiores diferenças entre os tratamentos foram observadas no teste de vigor, onde o tratamento azoxistrobina reduziu germinação, comprimento de raiz e de parte aérea. Analizando as duas cultivares, os tratamentos piraclostrobina + tiofanato Metílico + fipronil, tiofanato metílico + fluazinam e Carboxamida A apresentaram os maiores índices de vigor, enquanto metalaxil e dimetomorfe nas doses utilizadas houve as maiores reduções de vigor. Na incidência de patógenos associados as sementes, o tratamento tiofanato metílico + fluazinam mostrou-se eficiente na redução de *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. e *Drechslera* spp.

4 CAPÍTULO 2 EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS DE SEMENTES NO MANEJO DE MOSAICO COMUM DO TRIGO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VETOR.

4.1 RESUMO

O trigo no Brasil é cultivado principalmente na região sul. A ocorrência da virose mosaico comum do trigo reduz a produtividade, sendo que a utilização de cultivares resistentes é a medida preferencial para o manejo, porém não há cultivares imunes a essa doença. A dificuldade de manejo dessa doença é maior devido aos esporos de resistência do vetor permanecerem viáveis no solo por vários anos. O objetivo desse trabalho foi testar tratamentos de sementes a campo em área com histórico dessa doença. O ensaio foi conduzido a campo na área da Embrapa Trigo no município de Passo Fundo/RS, com 13 tratamentos de sementes nas cultivares TBIO Toruk e BRS Guamirim. A semeadura foi realizada no dia 4 de julho, sendo analisados os seguintes parâmetros: emergência de plântulas, massa fresca de raiz e parte aérea, incidência de mosaico em três épocas e massa de grãos. Para caracterização do vetor foram coletadas raízes de plantas apresentando sintomas de mosaico das cultivares (TBIO Toruk e BRS Guamirim). Utilizando microscópio ótico, foram observados no sistema radicular de plantas sintomáticas estruturas do plasmodioforomiceto, sendo visualizados zoósporo encistado e zoosporângio. Parte das raízes foram processadas no Laboratório de Virologia da Universidade do Estado de Santa Catarina em Lages, SC, onde foi realizado a extração de DNA e RNA, reações de PCR e sequenciamento. As análises moleculares confirmaram a presença de *P. graminis* em raízes de plantas com mosaico comum infectadas por Wheat stripe mosaic virus (WhSMV, nova espécie viral pertencente a família *Benyviridae*), sugerindo a transmissão desse vírus por *P. graminis*.

Palavras chaves: *Triticum aestivum*. Detecção. *Polymyxa graminis*. Virose.

4.2 INTRODUÇÃO

O mosaico comum é uma importante doença viral da cultura do trigo que causa reduções significativas de produtividade principalmente naquelas regiões que apresentam condições favoráveis de inverno frio e úmido, onde se cultiva trigo em áreas com inóculo (CHEN; WILSON, 1995). O manejo do mosaico comum no Brasil é dificultado pelo comportamento diferencial de cultivares tidas como resistentes e pela presença do plasmodioforomiceto vetor do vírus. No Brasil o mosaico comum do trigo é atribuído principalmente ao *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), sendo este vírus transmitido pela espécie *P. graminis*, um parasita obrigatório que infecta raízes de espécies da família Poaceae (CAETANO; KITAJIMA; COSTA, 1978).

Para detecção e caracterização do plasmodioforomiceto *P. graminis*, pode-se realizar a identificação via microscópio ótico. Entretanto, vários organismos apresentam características semelhantes, sendo necessário técnicas refinadas baseadas na detecção e sequenciamento de ácidos nucleicos para obter dados confiáveis, permitindo a identificação inequívoca de organismos específicos (JUNIOR et al., 2002).

Dentre as diversas cultivares de trigo disponíveis, BRS Guamirim e TBIO Toruk, apresentam suscetibilidade ao mosaico comum do trigo. A cultivar TBIO Toruk é considerada moderadamente suscetível ao mosaico comum, possui estatura baixa, perfilhamento e espigamento uniformes e uma boa resistência ao acamamento, atingindo altos níveis de produtividade (BIOTRIGO, 2014). A cultivar BRS Guamirim, possui estatura baixa de até 78 cm, ciclo superprecoce, sendo 75 dias até o espigamento e 125 dias até a maturação, sendo considerada suscetível ao vírus do mosaico (EMBRAPA, 2005).

Os sintomas mais característicos dessa virose nas plantas infectadas consistem em inibição do seu desenvolvimento, brotamento excessivo (enrosetamento) e a mistura das cores verde e amarela nas folhas, que dá a aparência de mosaico (MCKINNEY et al., 1925). Os sintomas nas folhas podem reduzir a fotossíntese, reduzindo o crescimento das plantas. A infecção com o vírus pode modificar a distribuição dos fotoassimilados, podendo a atividade meristemática e a diferenciação celular serem mais afetadas nas raízes do que na parte aérea da planta infectada (LARSEN; BRAKE; LANGENBERG, 1985).

Segundo Caetano (1982) em uma área em Passo Fundo/RS onde se cultivou trigo e apresentou sintomas de mosaico e, posteriormente, realizando rotação de culturas por cinco anos seguidos, quando retornou a semeadura de cultivar suscetível de trigo os sintomas surgiram de forma generalizada, comprovando que o vetor *P. graminis* pode permanecer viável por vários anos.

O uso de esterilizantes e desinfetantes como a cloropicrina, disulfito de carbono, álcool etílico e formaldeído podem erradicar ou reduzir o inóculo do vetor segundo Walsh (1998), mas devido ao impacto ambiental são impraticáveis em lavouras comerciais. O tratamento de sementes de trigo com fungicida pode trazer benefícios para diminuir a infecção do vetor (CHEN; WILSON, 1995).

Os tratamentos de sementes utilizados nesse trabalho têm como objetivo reduzir a infecção do vetor e, conseqüentemente, diminuir a transmissão do vírus. O plasmodioforomiceto *P. graminis* é relatado em vários países como o vetor do *Soil-borne wheat mosaic virus*, mas estudos recentes com o sequenciamento de nova geração (“*Next Generation Sequencing*”), sugerem uma nova espécie no Brasil, o *Wheat stripe mosaic virus* (WhSMV). Nesse sentido, outros objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização molecular de *P. graminis* e verificar a amplificação do fragmento da capa proteica do novo vírus (WhSMV) nas plantas sintomáticas utilizadas no ensaio de tratamento de sementes.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Ensaio de campo

4.3.1.1 Tratamento de sementes

Foram efetuados os tratamentos de sementes de duas cultivares de trigo, sendo TBIO Toruk (Biotrigo Genética) e BRS Guamirim (Embrapa Trigo). As sementes foram tratadas em sacos plásticos, adicionando-se os produtos em (g ou mL de i.a./100kg de sementes) em um volume de calda de produto + água + polímero de 2%. As sementes foram agitadas manualmente até a cobertura das mesmas. No tratamento testemunha, foi utilizado apenas água + polímero. As sementes foram secas à sombra por 48 horas. Os produtos utilizados para o tratamento das sementes de trigo, com as suas formulações, concentrações e doses estão descritos na tabela

5. Os produtos escolhidos para o ensaio apresentam o indutor de resistência acibenzolar-S-Metílico, esse produto possui indicação para viroses em outras culturas como o feijoeiro. A escolha por agentes de biocontrole foi para verificar possível comportamento antagônico desses agentes, podendo competir por substrato com o vetor. Quanto aos fungicidas, foram utilizados produtos com um ingrediente ativo (i.a.) e moléculas associadas de diversos grupos químicos para verificar o comportamento das mesmas na redução da incidência da doença viral por ação direta sobre o vetor *P. graminis*.

Tabela 5 - Produtos utilizados para os tratamentos das sementes de trigo, Lages, SC, 2017.

Tratamentos	Ingredientes Ativos - Concentração (g/L ou Kg)	Dose*
T1	Testemunha	
T2	<i>Bacillus subtilis</i> 13,68 g/L	10
T3	<i>Trichoderma asperellum</i> (mínimo 1 x 10 ¹⁰ UFC/g) 28%	100
T4	Acibenzolar-S- Metílico 500 g/kg	25
T5	Azoxistrobina 250 g/L	200
T6	Piraclostrobina 25g/L + Tiofanato Metílico 225g/L+ Fipronil 250 g/L	200
T7	Tiofanato Metílico 350 g/L + Fluazinam 52,5 g/L	200
T8	Fenamidona 500 g/L	200
T9	Fludioxonil 37,5 g/L + Metalaxil- M 30 g/L + Tiabendazole 300 g/L + Azoxistrobina 15 g/L	100
T10	Carboxamida A 330 g/L	45
T11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (2 x 10 ¹⁰ UFC/g)	10
T12	Metalaxyl 350 g/L	5,72
T13	Dimetomorfe 500 g/Kg	80

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Nota: * mL ou g de produto comercial / 100 kg de semente. Em todos os tratamentos foi adicionado polímero da empresa Incotec na dose de 200 mL/100kg de sementes.

4.3.1.2 Condução do ensaio

O ensaio foi conduzido a campo na unidade da Embrapa Trigo localizada em Passo Fundo no estado do Rio Grande do Sul. O experimento foi realizado com duas cultivares de trigo em solo infestado com *P. graminis*. O delineamento foi em blocos casualizados, com cinco repetições. A semeadura ocorreu em 04 de julho de 2017, foi realizada a abertura de sulcos, adubação com 300 kg/ha da fórmula 5-25-25 (N-P₂O₅-

K₂O) e semeadura manual. Cada tratamento foi composto por duas linhas de 0,5 m de comprimento com 36 sementes/linha, sendo uma linha destrutiva (avaliação de massa fresca de raiz e parte aérea) e outra para avaliação da incidência de mosaico comum do trigo e rendimento de grãos. Para evitar o efeito de outras doenças, pragas e plantas daninhas, foram realizados tratamentos culturais com fungicidas, inseticidas e herbicidas nas doses indicadas para a cultura do trigo (CBPTT, 2017). Sendo realizada aplicação de inseticida e fungicida a cada intervalo de 15 dias. Foi realizada irrigação complementar na área desde a semeadura até dia 10/08, devido à baixa precipitação. A aplicação de nitrogênio em cobertura foi feita na forma de ureia em uma dose de 200 kg de ureia/ha. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância, utilizando o pacote estatístico ExpDes.pt, Ferreira, Cavalcanti e Nogueira, 2013 implementado no software R versão 3.4.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Os valores de F para os efeitos principais e as interações foram considerados significativos ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Quando alcançada significância realizou-se o teste de comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.3.1.3 Contagem de plantas emersas

O número de plantas normais emergidas foi determinado no dia 20 de julho, por contagem manual em cada parcela do ensaio sendo realizada 10 dias após a emergência (DAE) das plântulas.

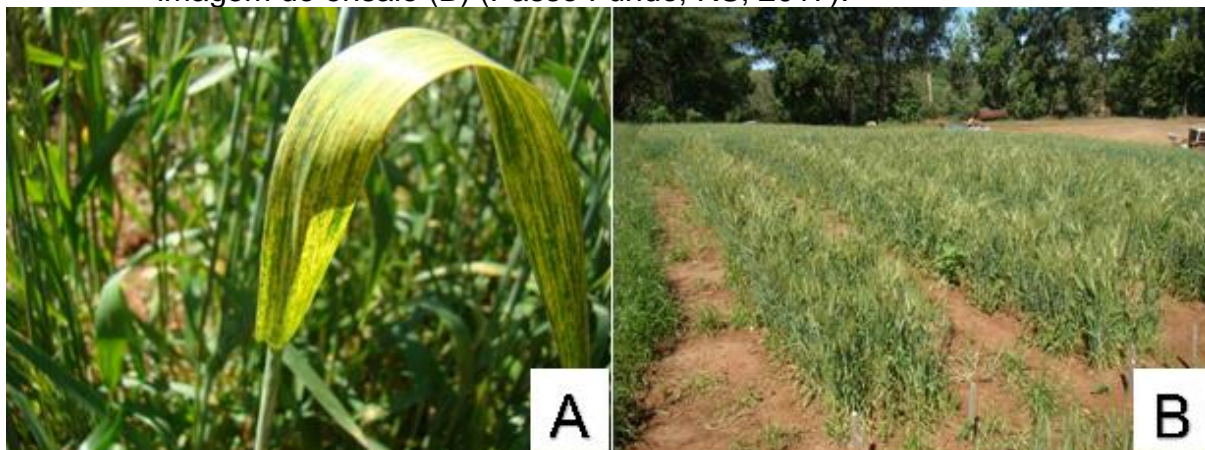
4.3.1.4 Massa fresca de raiz e parte aérea

Aos 42 dias DAE foi realizado uma avaliação da massa fresca de raiz e parte aérea nas linhas destinadas as coletas de amostras. Foram coletadas 2 plantas com o sistema radicular por tratamento e cultivar de cada repetição, sendo essas escolhidas ao acaso nos cinco blocos. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água corrente, divididas em parte aérea e raiz e pesadas em balança de precisão, sendo o resultado expresso em gramas.

4.3.1.5 Avaliação de incidência da virose

Foi avaliado a incidência pela observação de sintomas de mosaico comum do trigo nas plantas (Figura 2A), expressando em porcentagem e baseando-se no número de plantas emersas. A primeira avaliação visual foi realizada 30 DAE. A segunda avaliação ocorreu 57 DAE (estádio de emborrachamento). A terceira avaliação foi realizada no estágio de florescimento do trigo, sendo para a cultivar BRS Guamirim 74 DAE e para a cultivar TBIO Toruk 79 DAE.

Figura 2 - Sintoma de mosaico comum do trigo em folha da cultivar TBIO Toruk (A), imagem do ensaio (B) (Passo Fundo, RS, 2017).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

4.3.1.6 Rendimento de grãos

Ao atingir a maturação de colheita, as plantas foram colhidas e levadas para uma sala de ambiente climatizado, posteriormente as plantas foram trilhadas e realizou-se a pesagem dos grãos em balança de precisão, apresentando os valores em gramas.

4.3.2 Caracterização do vetor

4.3.2.1 Observação de *Polymyxa graminis* nas raízes de trigo

Foram coletadas plantas de trigo com sintomas de mosaico comum das cultivares TBIO Toruk e BRS Guamirim no município de Passo Fundo/RS, na estação

experimental da Embrapa trigo, sendo seccionadas as raízes, realizando um *pool* de amostra para cada cultivar.

Para a visualização de estruturas de *P. graminis*, as raízes foram lavadas em água corrente e secas em papel toalha. Posteriormente, foram mergulhadas em solução de 10 ml de ácido láctico, 20 ml de glicerina, 10 ml de água destilada, 10 g de fenol cristalizado e 0,5 g de corante azul de algodão, sendo então aquecidas até atingir 100° C. Após o aquecimento, foram montadas lâminas e visualizadas as estruturas de vetor em microscópio ótico (Leitz, Laborlux) com aumento de 400 vezes.

4.3.2.2 Teste de PCR para *P. graminis*

Parte das raízes coletadas de cada cultivar foi utilizada para caracterização molecular de *P. graminis*. As raízes foram lavadas em água corrente e secadas com papel toalha, sendo maceradas em nitrogênio líquido. Foram utilizados 100 mg de raiz para extração de DNA total utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987).

A PCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos Pgfwd2/Pxrev7 (WARD e ADAMS, 1998). O volume total da reação de PCR foi de 25 µl, contendo 1 µl de DNA (100 ng/µl), 5 µl de tampão 5x, 2µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,5µl de cada iniciador (10 mM) e 0,25 µL de Taq polimerase (5 U/µl) (Promega), o volume final foi completado com água ultrapura. As condições da PCR foram realizadas conforme descrito por Tyagi et al. (2016). Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram submetidos a eletroforese e analisado em gel de agarose 1%, corados com GelRed (Biotium), visualizado sob luz UV em transluminador e fotografado.

Os fragmentos de PCR foram purificados utilizando o Kit Gene Jet (Fermentas) de acordo com as recomendações do fabricante e, posteriormente, os fragmentos purificados foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos Pgfwd2/Pxrev7 (Helixxa).

4.3.2.3 Análise filogenética de *P. graminis*

As seqüências foram depositadas no GenBank e analisadas comparativamente com seqüências do banco de dados. A árvore filogenética foi construída com o método de máxima verossimilhança implementado no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013), utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros com sítios invariantes (I). O suporte

bootstrap usado foi de 1000 repetições. Para o alinhamento utilizado na filogenia, foi utilizada a ferramenta MUSCLE disponível no programa MEGA 6.0.

4.3.3 Detecção do vírus

Para a detecção do vírus Wheat stripe mosaic virus (WhSMV), foi realizada a extração de RNA total a partir das raízes das duas cultivares analisadas, utilizando o Kit *AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep* (AXYGEN BIOSCIENCES), conforme as recomendações do fabricante. Para a síntese do DNA complementar (cDNA), 1 µL de RNA total foi desnaturado a 94°C por 5 minutos seguido de síntese da fita de cDNA utilizando o iniciador oligo dT e o kit *ImProm II Reverse Transcription System*, conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, para a realização da reação de PCR, foram utilizados 5 µL do cDNA (~ 1µg), 10 µL de tampão 5X PCR, 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 1 µL dos respectivos pares de iniciadores para capa proteica (CP-F 5' AAGTGTCGCAAGCTTCGCG '3 e CP-R 5' AAGTGTCGCAAGCTTCGCG '3), 0,25 µL da enzima Go Taq DNA Polimerase (5 u/µL) (Promega) e água livre de RNase para um volume final de 50 µL. O programa do termociclador constou de um ciclo de 94°C por 2 minutos, 34 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo para extensão final utilizando 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRed (Biotium), visualizados sob luz UV em transluminador e fotografados.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Ensaio de campo

4.4.1.1 Plantas emersas

Para a cultivar TBIO Toruk os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 6). Para a cultivar BRS Guamirim, os tratamentos *Trichoderma asperellum* e azoxistrobina apresentaram os maiores índices de plantas emersas, diferindo estatisticamente do tratamento fludioxonil + metalaxil +

tiabendazole + azoxistrobina, possivelmente devido a fitotoxicidade dos fungicidas. Em trabalho realizado por Ulguim et al. (2013) em casa de vegetação utilizando a cultivar de trigo Fundacep Horizonte, não foram encontradas diferenças na emergência de plantas entre os tratamentos de sementes utilizando os fungicidas triadimenol (25,11 g i.a. ha⁻¹), carboxina + tiram (75 g i.a. ha⁻¹) e testemunha.

Tabela 6 - Plantas emersas a campo em cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).

Tratamentos	Plantas Emersas	
	TBIO Toruk	BRS Guamirim
Testemunha sem aplicação	29,4 ns	31,6 ab
<i>Bacillus subtilis</i>	28,6	29,4 ab
<i>Trichoderma asperellum</i>	29,2	33,2 a
Acibenzolar-S- Metílico	28,6	32,0 ab
Azoxistrobina	29,2	33,2 a
Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil	29,8	32 ab
Tiofanato Metílico + Fluazinam	28,8	32,6 ab
Fenamidona	27,2	31,6 ab
Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina	30,2	27,8 b
Carboxamida A	29,0	31,0 ab
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	32,6	32,2 ab
Metalaxil	31,2	31,8 ab
Dimetomorfe	29,4	31,2 ab
CV (%)	7,9	7,2

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. ns : não significativo.

4.4.1.2. Massa fresca de raiz e parte aérea

Na massa fresca da parte aérea da cultivar TBIO Toruk os seguintes tratamentos: testemunha, *Trichoderma asperellum*, azoxistrobina, piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, fludioxonil + metalaxil + tiabendazole + azoxistrobina e Carboxamida A apresentaram maiores valores de massa fresca da parte aérea, porém

não apresentaram diferença significativa. Os menores valores de massa fresca da parte aérea foram observados nos tratamentos: fenamidona (3,2 g), *Bacillus amyloliquefaciens* (3,9 g) que diferenciaram da testemunha, esse comportamento possivelmente foi devido ao efeito de fitotoxicidade para as plântulas de trigo nos estádios iniciais. Para massa fresca de raiz na cultivar TBIO Toruk os tratamentos acibenzolar-s-metílico, piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, tiofanato metílico + fluazinam e Carboxamida A apresentaram as maiores massas, enquanto que os tratamentos azoxistrobina, fenamidona e metalaxil as menores massas de raiz (Tabela 7). Para a cultivar BRS Guamirim os melhores resultados de massa fresca da parte aérea foram nos tratamentos: testemunha, acibenzolar-s-metílico, tiofanato + fluazinam, Carboxamida A e dimetomorfe, sendo que os menores valores foram observados nos tratamentos azoxistrobina, *Bacillus subtilis*, testemunha, piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, fenamidona e metalaxil. Para massa fresca da raiz, a cultivar BRS Guamirim apresentou as maiores massas para os tratamentos: testemunha, azoxistrobina e dimetomorfe, enquanto os tratamentos *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* apresentaram as menores massas fresca de raiz (Tabela 7). De um modo geral, os tratamentos com agentes de biocontrole não apresentaram dados satisfatórios de incremento para massa fresca de raiz e parte aérea.

No trabalho realizado por Ishikawai, Batista e Igarashi (2012) em casa de vegetação, com as cultivares de trigo Mirante e CD 104, utilizando os fungicidas difenoconazole e carboxin + thiram, nas doses de 30 + 50 + 50g do ingrediente ativo, respectivamente, por 100kg de sementes, os autores observaram aos 41 dias após a semeadura que a testemunha foi superior em acúmulo de massa fresca de raiz e parte aérea, diferindo dos tratamentos difenoconazole e carboxin + thiram. Segundo os autores esse comportamento pode ser explicado por um possível efeito fitotóxico dos produtos no desenvolvimento das plantas. Esses dados corroboram com o que foi descrito nesse trabalho, sendo que a testemunha, em alguns casos, não diferiu da maioria dos tratamentos.

Tabela 7 - Massa fresca de raiz e parte aérea 42 dias após emergência de cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).

Tratamentos	TBIO Toruk		BRS Guamirim	
	Massa fresca de parte aérea (gramas)	Massa fresca de raiz (gramas)	Massa fresca de parte aérea (gramas)	Massa fresca de raiz (gramas)
Testemunha sem aplicação	5,5 ab	0,7 cde	6,0 cd	0,9 abc
<i>Bacillus subtilis</i>	4,3 bcd	0,8 bcd	4,9 cd	0,6 e
<i>Trichoderma asperellum</i>	5,2 abc	0,7 cde	5,0 cd	0,8 abcd
Acibenzolar-S- Metílico	4,4 bcd	0,8 abc	5,8 abcd	0,7 cde
Azoxistrobina	5,0 abc	0,7 de	4,9 cd	1,0 a
Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil	5,6 ab	0,9 ab	4,6 cd	0,9 abcd
Tiofanato Metílico + Fluazinam	4,4 bcd	1,0 a	5,9 abcd	0,9 abcd
Fenamidona	3,2 d	0,6 e	4,7 cd	0,8 abcd
Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina	5,0 abc	0,8 bcde	5,5 bcd	0,8 bcde
Carboxamida A	5,9 a	0,9 ab	6,9 ab	0,8 abcd
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3,9 cd	0,7 cde	5,1 cd	0,7 de
Metalaxyl	4,3 bcd	0,7 de	4,4 d	0,8 bcde
Dimetomorfe	4,56 bc	0,7 cde	7,2 a	1,0 ab
CV (%)	12,3	9,9	13,3	11,3

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

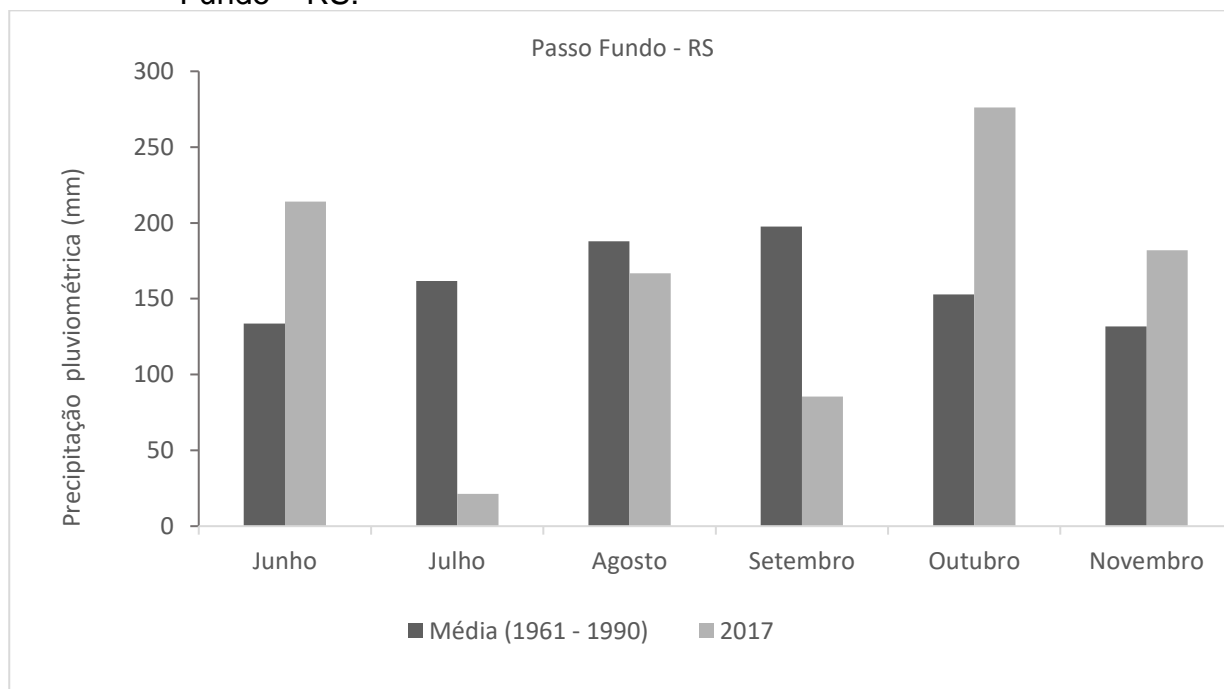
Nota: Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%

4.4.1.3 Incidência de mosaico comum do trigo

O ensaio apresentou incidência da doença abaixo do esperado para a adequada avaliação de doença. Comparando o histórico registrado pela estação meteorológica da Embrapa Trigo localizada próxima ao ensaio, observam-se temperaturas médias mais elevadas e baixa precipitação de chuvas (Figura 3). Esses fatores ambientais em estádios iniciais da cultura (mês de julho) dificultam que o solo permaneça encharcado, sendo desfavorável para que o vetor parasite as raízes de trigo e transmita o vírus (LAU, 2017). Mesmo com baixas porcentagens de incidências nas parcelas, se considerarmos a indicação de população de plantas por área, por

exemplo a cultivar TBIO Toruk de 330 plantas finais por m² (BIOTRIGO, 2014), a baixa incidência ainda é importante sobre o ponto de vista agrônomo devido a população de plantas utilizada no cultivo desse cereal.

Figura 3 - Precipitação pluviométrica em milímetro (mm), no município de Passo Fundo – RS.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Nota: Dados da estação meteorológica da Embrapa Trigo – RS.

A cultivar TBIO Toruk apresentou menor incidência (Tabela 8) em comparação a cultivar BRS Guamirim, sendo que na primeira avaliação as plantas não apresentaram sintomas de mosaico comum do trigo. Na segunda avaliação, para a cultivar TBIO Toruk não houve diferença significativa entre os tratamentos. Para BRS Guamirim houve diferença entre azoxistrobina que apresentou controle de 83% em relação a testemunha.

Em experimento conduzido em solo infestado com *P. graminis*, Machry et al. (2016) utilizando os tratamentos de sementes de trigo com triadimenol (0,27 ml.ha⁻¹), metalaxil-M + fludioxonil (0,2 l.ha⁻¹), propiconazol (0,18 l.ha⁻¹), piraclostrobina (0,18 l.ha⁻¹) e azoxistrobina (0,18 l.ha⁻¹), verificaram que o tratamento azoxistrobina obteve a menor média de porcentagem de plantas infectadas aos 91 dias após a semeadura, diferenciando estatisticamente da testemunha. Além da azoxistrobina, o tratamento de sementes de trigo com triadimenol também reduziu o número de plantas infectadas quando comparado a testemunha, não diferindo estatisticamente do tratamento com

azoxistrobina. Além do efeito sobre o vetor e a transmissão do vírus do mosaico comum, as estrobilurinas, com destaque para a azoxistrobina, podem afetar positivamente aspectos relacionados a fisiologia da planta. Segundo Weisz et al. (2011) o grupo das estrobilurinas, ao qual pertence a azoxistrobina, em aplicação aérea pode causar o aumento no teor da clorofila, aumentando a coloração verde podendo aumentar a produtividade das culturas. Entretanto, vale destacar, como apresentado no primeiro capítulo dessa dissertação, que na fase inicial de desenvolvimento da plântula o efeito pode ser negativo.

Tabela 8 - Incidência e controle de mosaico comum do trigo em estágio de alongamento em cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).

Tratamentos	TBIO Toruk		BRS Guamirim	
	I (%)	C (%)	I (%)	C (%)
Testemunha sem aplicação	1,9 ns	0	7,2 a	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2,4	0	5,0 ab	30,7
<i>Trichoderma asperellum</i>	2,9	0	4,8 ab	33,0
Acibenzolar-S- Metílico	1,5	22,9	3,1 ab	43,5
Azoxistrobina	1,2	37,0	1,2 b	83,1
Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil	0,6	66,1	3,9 ab	53,5
Tiofanato Metílico + Fluazinam	1,5	22,9	3,7 ab	48,2
Fenamidona	2,2	0	4,4 ab	38,5
Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina	2,6	0	6,5 a	9,7
Carboxamida A	1,3	32,8	5,0 ab	30,7
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,2	36,5	4,7 ab	34,3
Metalaxil	1,2	37,5	3,8 ab	48,0
Dimetomorfe	3,4	0	4,7 ab	34,3
CV (%)	46,8		32,1	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. ns: não significativo. I: Incidência; C: controle.

Na terceira avaliação no estágio de florescimento (Tabela 9), houve um aumento na incidência de mosaico nos tratamentos em comparação a segunda avaliação, tendo praticamente o mesmo comportamento de aumento linear para os tratamentos. Para TBIO Toruk o tratamento azoxistrobina apresentou a menor

incidência, porém não diferenciou dos tratamentos: *Bacillus subtilis*, Acibenzolar-S-Metílico, Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil, Tiofanato Metílico + Fluazinam, Fenamidona, Carboxamida A, *Bacillus amyloliquefaciens* e Dimetomorfe. Para BRS Guamirim o maior controle foi 81,6%, também no tratamento azoxistrobina, apresentando diferença para os tratamentos testemunha e Fludioxonil + Metalaxil-M + Tiabendazole + Azoxistrobina, o qual também possui a molécula azoxistrobina na sua fórmula, porém, em menor concentração. As incidências do mosaico comum nos tratamentos utilizando os agentes de biocontrole para cultivar TBIO Toruk foram: (4,8 %) *Bacillus subtilis*, (5,2%) *Trichoderma asperellum*, não diferenciando da testemunha (6,9%), apenas *Bacillus amyloliquefaciens* (3,1%) apresentou diferença. Na cultivar BRS Guamirim *Trichoderma asperellum* (5,9%) e *Bacillus amyloliquefaciens* (5,9%), as quais não apresentaram diferença com a testemunha (10,4%). Foi observado diferença com relação a testemunha apenas para *Bacillus subtilis* (3,4%).

Quanto ao indutor de resistência acibenzolar-s-metílico, foi verificada diferença estatística somente na cultivar BRS Guamirim, na redução da incidência de mosaico. Um melhor resultado poderia ser visualizado com aplicações aéreas na fase vegetativa, como é a recomendação desse produto para mosaico dourado na cultura do feijoeiro. Segundo Kessmann et al. (1995), acibenzolar-S-metílico (ASM) é um composto sintético, análogo funcional do ácido salicílico, capaz de ativar defesas de plantas. Em trabalho realizado por Santos et al. (2011) aplicações aéreas demonstraram aumento da eficácia dos fungicidas com a inclusão de ASM em um programa de controle químico na cultura da soja.

Tabela 9 - Incidência de mosaico comum do trigo em estágio de florescimento em cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).

Tratamentos	TBIO Toruk		BRS Guamirim	
	I (%)	C (%)	I (%)	C (%)
Testemunha sem aplicação	6,9 a	0	10,4 a	0
<i>Bacillus subtilis</i>	4,8 abc	30,8	3,4 bc	67,6
<i>Trichoderma asperellum</i>	5,2 ab	24,9	6,0 abc	42,9
Acibenzolar-S- Metílico	3,5 abc	48,9	3,4 bc	67,6
Azoxistrobina	1,2 c	82,5	1,9 c	81,6
Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil	3,9 abc	44,0	4,3 bc	59,0
Tiofanato Metílico + Fluazinam	4,2 abc	38,5	3,3 bc	68,4
Fenamidona	4,0 abc	41,8	5,7 abc	45,4
Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina	6,0 ab	12,6	7,3 ab	29,9
Carboxamida A	2,9 bc	58,3	7,0 abc	33,3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3,1 bc	54,4	5,9 abc	43,9
Metalaxil	2,5 bc	64,2	6,3 abc	39,6
Dimetomorfe	4,7 abc	32,1	6,7 abc	35,4
CV (%)	40,3		43,1	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. I: Incidência, C: controle.

4.4.1.4 Rendimento de grãos

A cultivar TBIO Toruk não apresentou diferença em produtividade em função dos tratamentos (Tabela 10). Vale ressaltar que embora não houve diferença estatística, o tratamento tiofanato metílico + fluazinam apresentou o maior rendimento. Para BRS Guamirim o tratamento tiofanato metílico + fluazinam apresentou o melhor resultado, e diferenciou dos tratamentos *Trichoderma asperellum*, Acibenzolar-S- Metílico, Azoxistrobina, Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil, Carboxamida A, *Bacillus amyloliquefaciens*, fenamidona e dimetomorfe. As menores produtividade foram observadas nos tratamentos Testemunha, *Bacillus subtilis*, Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina e metalaxil.

No trabalho realizado por Ulguim et al. (2013) a campo, com intuito de testar diferentes tratamentos de sementes de trigo em área sem inóculo de *P. graminis*, não

encontrou diferença no rendimento de grãos entre os tratamentos utilizando os fungicidas triadimenol (25,11 g i.a. ha⁻¹), carboxina + tiram (75 g i.a. ha⁻¹) e testemunha, utilizando a cultivar Fundacep Horizonte.

De acordo com Machry et al. (2016) em solo infestado com *P. graminis*, o tratamento azoxistrobina foi estatisticamente superior ao tratamento controle e triadimenol em rendimento de grãos, seguidos dos tratamentos metalaxil-M + fludioxonil, piraclostrobina e propiconazol, que não obtiveram diferença do tratamento controle e triadimenol. Em trabalho realizado por Wesp et al. (2012) com os tratamentos triadimenol, fludioxonil + metalaxil, propiconazole, piraclostrobina e azoxistrobina. O tratamento azoxistrobina obteve a menor incidência e maior rendimento de grãos, diferenciando estatisticamente para o rendimento dos demais tratamentos. Em comparação, nesse trabalho o tratamento azoxistrobina obteve a menor incidência, mas o maior rendimento de grãos foi observado no tratamento tiofanato metílico + fluazinam com 43,7 gramas por parcela na TBIO Toruk e 47,1 gramas para BRS Guamirim. Embora para TBIO Toruk não tenha havido diferença significativa, se extrapolarmos para produtividade em kg/ha, a testemunha com 39,8 g em 0,5 metros lineares com espaçamento de 0,20 m entre linhas, obtemos 3.978 Kg/ha, enquanto o tratamento tiofanato metílico + fluazinam 4.366 Kg/ha, obtendo acréscimo 388 kg/ha, sendo um valor significativo considerando a baixa incidência apresentada no ensaio.

Tabela 10 - Massa de grãos das cultivares de trigo TBIO Toruk e BRS Guamirim, em função da aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole e indutor de resistência em tratamentos de sementes (Passo Fundo, RS, 2017).

Tratamentos	Massa de grãos	
	TBIO Toruk	BRS Guamirim
Testemunha sem aplicação	39,8 ns	39,9 bc
<i>Bacillus subtilis</i>	41,7	35,1 c
<i>Trichoderma asperellum</i>	39,0	45,0 ab
Acibenzolar-S- Metílico	38,7	43,0 ab
Azoxistrobina	40,0	43,9 ab
Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil	41,9	43,1 ab
Tiofanato Metílico + Fluazinam	43,7	47,1 a
Fenamidona	41,9	43,2 ab
Fludioxonil + Metalaxil- M + Tiabendazole + Azoxistrobina	40,7	39,1 bc
Carboxamida A	40,7	42,9 ab
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	38,6	38,5 ab
Metalaxil	37,1	35,0 c
Dimetomorfe	42,1	42,5 ab
CV (%)	10,9	7,7

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

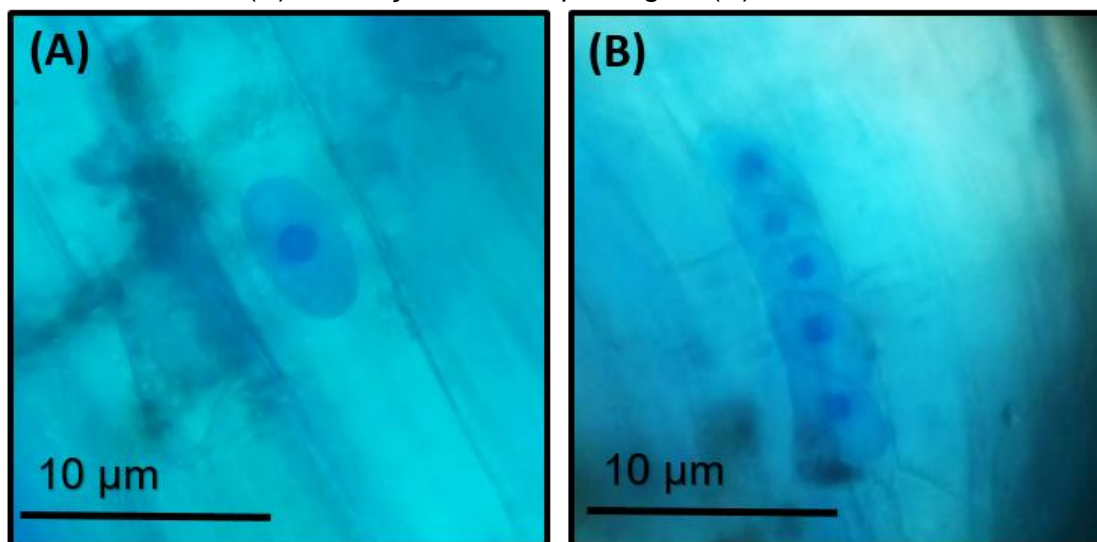
Nota: Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. ns : não significativo.

4.4.2 Caracterização do vetor

4.4.2.1 Observação de *P. graminis* nas raízes de trigo

Os possíveis agentes causais do mosaico comum do trigo são transmitidos por parasitas do sistema radicular pertencentes à família Plasmodiphorales. Baseado nessas informações, foram coletadas raízes de plantas sintomáticas de trigo de duas cultivares (BRS Guamirim e TBIO Toruk). A presença do vetor nas raízes de trigo foi confirmada por microscopia ótica, sendo possível visualizar o zoósporo encistado (Figura 4A) e a formação de zoosporângio (Figura 4B), em ambas as cultivares. As estruturas morfológicas encontradas correspondem às descritas por Ledingham, que descreveu *Polymyxa graminis* em 1939. As imagens do vetor observadas na figura 4, são similares as observadas por Tyagi et al., (2016), que analisando raízes de cevada, observou as diferentes fases do ciclo de vida de *P. graminis*.

Figura 4 - Caracterização do vetor *Polymyxa graminis* em raízes infectadas de trigo (cvs. TBIO Toruk e BRS Guamirim) em diferentes estágios: zoósporo encistado (A), formação de zoosporângios (B).



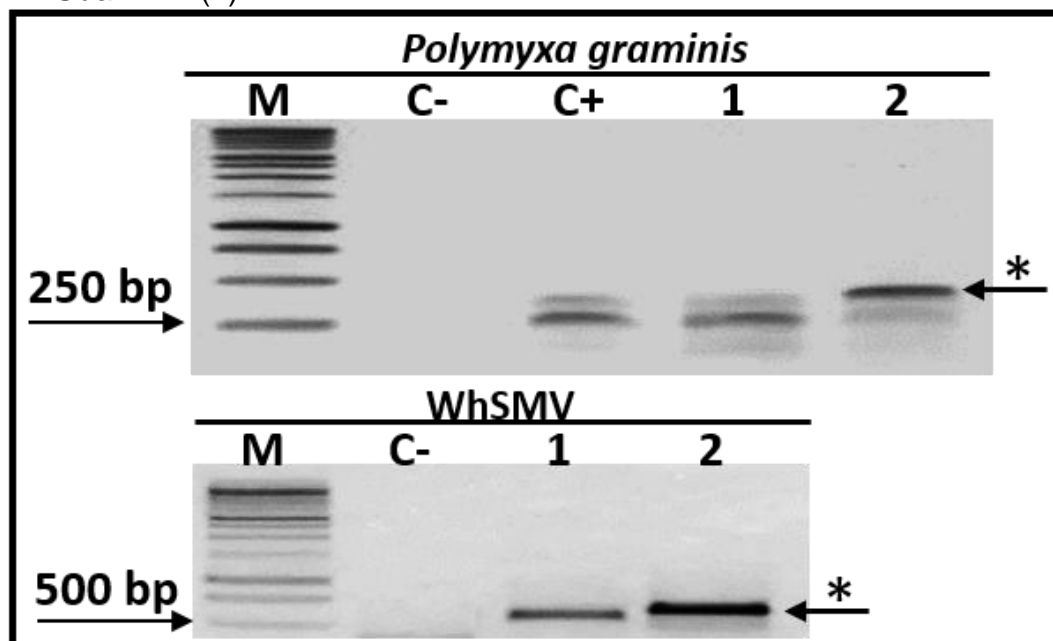
Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

4.4.2.2 Teste de PCR das amostras para detecção de *P. graminis* e do vírus

Para suportar os dados morfológicos descritos acima, parte das raízes analisadas foi utilizada para detecção e caracterização molecular do vetor, além da detecção do novo vírus (Wheat stripe mosaic virus - WhSMV) associado aos sintomas de mosaico em trigo. Para detecção do vírus utilizando iniciadores para capa proteica do vírus, foi possível observar a amplificação de tamanho esperado para essa região de 621 pares de bases conforme (figura 5) para as duas cultivares estudadas. Para o vetor, utilizando oligonucleotídeos específicos para o DNA ribossomal de *P. graminis* e para a região codificadora da capa proteica do WhSMV, foi possível visualizar a amplificação em gel de agarose dos fragmentos esperados a partir das amostras de raízes das duas cultivares analisadas (Figura 5). O par de oligonucleotídeos utilizado nesse trabalho (Pgfwd2/Pxrev7) é específico para *P. graminis* e resulta, após a reação de PCR, na amplificação de fragmentos de 270 a 320 pb (WARD e ADAMS, 1998). Após o sequenciamento e análise, verificou-se que os fragmentos de *P. graminis* obtidos nesse trabalho apresentaram identidade de nt de 98% entre si e 100% de identidade de nt entre os isolados do Brasil (BRS Guamirim, GenBank nº MH318570), Bélgica (GenBank nº AM259278) e Reino Unido (GenBank no AJ841287). Já o isolado TBIO Toruk apresentou 99% de identidade de nt com os isolados de *P. graminis* da

República Checa (GenBank nº LT221860) e da Austrália (GenBank nº KF535921) demonstrando alta similaridade de nt, demonstrando ser a espécie *P. graminis*.

Figura 5 - Análise de eletroforese para detecção molecular de *Polymyxa graminis* e Wheat stripe mosaic virus (WhSMV) em cultivares TBIO Toruk (1) e BRS Guamirim (2).



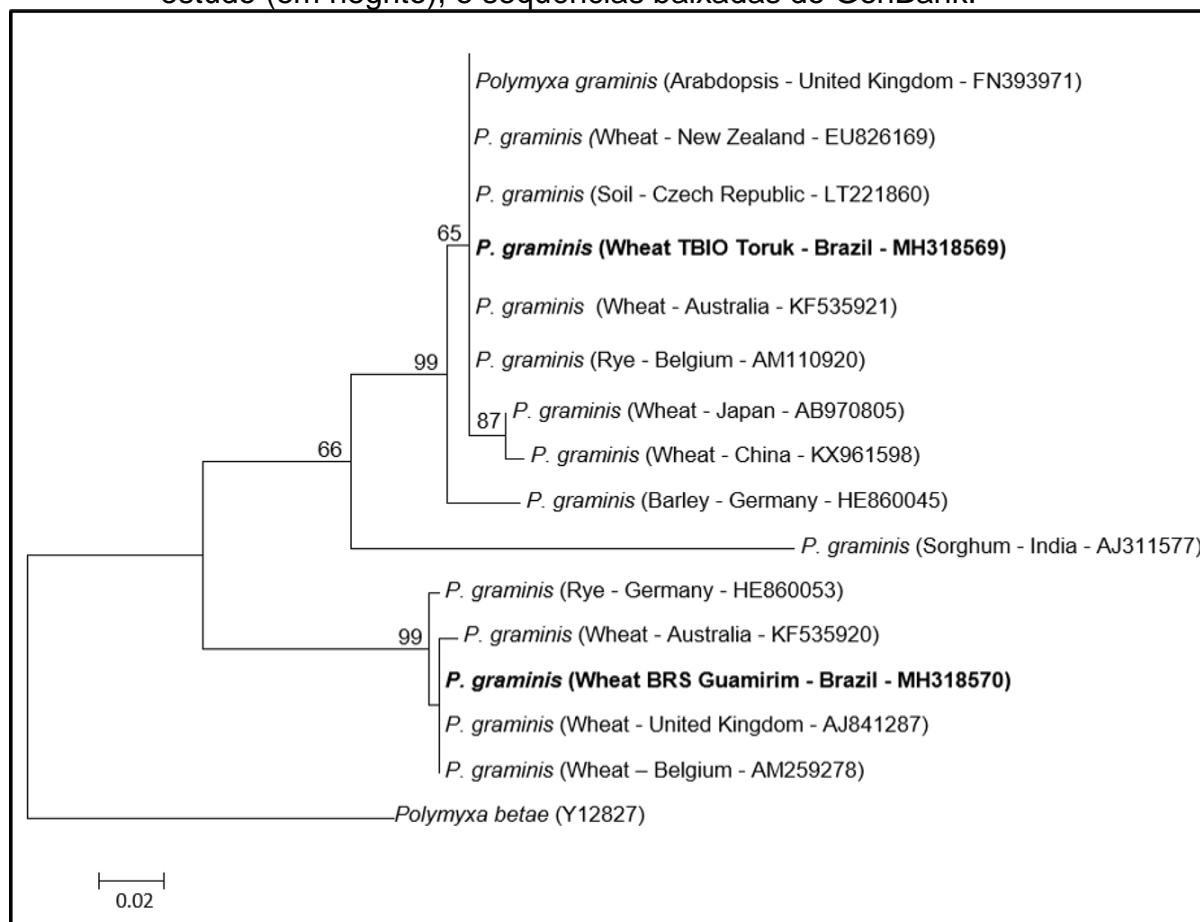
Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Nota: Marcador molecular 1 Kb; C +, DNA total de raízes de trigo infectadas por *Polymyxa graminis* (controle positivo); C-, controle negativo (água); * Seta, indica a banda que foi recortada do gel para purificação e sequenciamento.

4.4.2.3 Análise filogenética de *P. graminis*

A análise filogenética de parte do DNA ribossomal suporta a classificação do plasmodioforomiceto encontrado nas raízes das duas cultivares de trigo como *P. graminis*. Isolados de diferentes países e hospedeiros formaram dois grupos distintos, sem ocorrer à separação devido ao hospedeiro ou região geográfica (Figura 7). Inclusive os dois isolados de *P. graminis* caracterizados nesse estudo encontram-se em grupos distintos. Essas diferenças são esperadas, visto que estudos moleculares revelaram alta diversidade dessa espécie, encontrando diferenças na gama de hospedeiros, requisitos de temperatura e características do genoma (LEGREVE; DELFOSSE; MARAITE, 2002). Outro estudo recente realizado na China, utilizando a região ITS do DNA ribossomal de *P. graminis* obtida a partir de 63 amostras de raízes de trigo, indica uma considerável variação das sequências (XU et al., 2018).

Figura 6 - Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências de parte do DNA ribossomal nuclear 5.8S e Internal transcribed spacer (ITS1) de *Polymyxa graminis*, incluindo isolados brasileiros caracterizados neste estudo (em negrito), e sequências baixadas do GenBank.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Nota: Os números nos ramos indicam valores de bootstrap (1000 replicações). As espécies onde o vetor foi detectado, país e os números de acesso, são apresentados na figura, tendo o *Polymyxa betae* como espécie contrastante (*outgroup*).

4.5 CONCLUSÕES

Os agentes de biocontrole utilizados no trabalho não aumentaram massa fresca de raiz e parte aérea de plântulas de trigo para as cultivares TBIO Toruk e BRS Guamirim.

O tratamento azoxistrobina apresentou a menor incidência de mosaico comum do trigo nas duas épocas estudadas para as duas cultivares.

As sementes de trigo tratadas com tiofanato metílico + fluazinam resultaram em maior rendimento de grãos, embora não tenha diferença estatística na cultivar TBIO Toruk.

Os resultados da caracterização morfológica, molecular e filogenia indicam a associação de *P. graminis* com raízes de plantas de trigo com sintomas de mosaico e infectadas por WhSMV no Brasil. Os dados apresentados sugerem que o vírus WhSMV é transmitido pelo plasmodioforomiceto *P. graminis*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho abordou sobre a caracterização do vetor e sobre tratamento de sementes para manejo da virose do mosaico comum do trigo. O estudo do controle do vetor do vírus utilizando tratamento de sementes é uma estratégia importante, pois em áreas infestadas com o vetor pode auxiliar no manejo dessa doença, tendo em vista que não há cultivares imunes ao vírus. Uma vez que estabelecido o melhor produto e dose os danos causados na cultura do trigo podem ser minimizados. Existem poucos trabalhos sobre essa doença na cultura do trigo, sendo necessário estudos adicionais em anos subsequentes para consolidar o tratamento de sementes como estratégia de manejo. Também é fundamental verificar o efeito desses produtos sobre parâmetros fisiológicos e de desenvolvimento das plântulas, uma vez que devem afetar negativamente apenas o patógeno. O setor produtivo carece de informações e suporte no que diz respeito as informações técnicas para manejo de viroses na cultura.

A caracterização do vetor com as técnicas moleculares é de grande valia para de fato comprovar com confiabilidade a ocorrência da espécie em determinado local e qual cultura esta associado, possibilitando desenvolver estratégias de manejo tendo em vista a redução dos danos causados pela sua capacidade de transmissão de vírus.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; SWABY, A. G.; MACFARLANE, I. The susceptibility of barley cultivars to *Barley yellow mosaic virus* (BAYMV) and its fungal vector, *Polymyxa graminis*. **Annals of Applied Biology**, Grã-Bretanha, v.109, p. 561-572, 1986.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. Burlington, USA: Elsevier Academic Press, 2005. 952 p.

BALARDIN, R. S.; SILVA, F. D. L.; DEBONA, D.; CORTE, G. D.; FAVERA, D. D.; TORMEN, N. R. Tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas como redutores dos efeitos do estresse hídrico em plantas de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1120-1126, 2011.

BECK, C.; OERKE, E.C.; DEHNE, H.W. Impact of strobilurins on physiology and yield formation of wheat. **Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biologische Wetenschappen**, v.67, p.181-187, 2002.

BIOTRIGO GENÉTICA LTDA. **Informações sobre a cultivar TBIO Toruk**. Passo Fundo, 2014. Disponível em: <<http://www.biotrigo.com.br/cultivares/internaCultivar>>. Acesso em 3 dez. 2017.

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

BRYSON, R. J.; LEANDRO, L.; JONES, D. R. The physiological effects of kresoxim-methyl on wheat leaf greenness and the implication for crop yield. In: Proceedings of the righton Crop Protection Conference - Pests and Diseases. **Proceedings...** British Crop Protection Council, Farnham, 2000. p. 739-747.

BRUNT, A. A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M. J.; GIBBS, A. J.; WATSON, L. Viruses of plants-descriptions and lists from the vide database. **CAB International**, Wallingford, UK, p. 1484, 1996.

CADLE-DAVIDSON, L.; SORRELLS, M. E.; GRAY, S. M.; BERGSTROM, G. C. Identification of small grains genotypes resistant to *Soil borne wheat mosaic virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 8, p. 1039-1044, 2006.

CAETANO, V. R., KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Ocorrência e estudos electrono-microscópios do vírus do mosaico do trigo, transmitido pelo solo, no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 3, p. 39-36, 1978.

CAETANO, V. R. **Mosaico do trigo transmitido pelo solo *Wheat soil-borne mosaic virus Tobamovirus***. In: Fundação Cargill. Trigo no Brasil. Campinas. v.2, 1982, p.563-570.

CAETANO, V. R.; PIEROBOM, C. R.; LUZZARDI, C. G.; PRESTES, A. M. Mosaico do trigo começa a causar problemas. Indicação da Pesquisa XIII. Inst. **Pesquisa Agropecuária Sul**, DNPEA, 2 p.1971.

CAETANO, V. R., MARINHO, V. L. A., LIN, M. T., FORMIGA, L. C. M., KITAJIMA, E. W. Ocorrência do vírus do mosaico do capim bromo ("*Brome mosaic virus*") em trigo no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 15, p. 363-365, 1990.

CAETANO, V. R. **Estudo sobre o vírus do nanismo amarelo da cevada, em trigo, no Rio Grande do Sul**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

CAETANO, V.R. O impacto das doenças do trigo transmitidas por vetores. **Correio Agrícola**, São Paulo, n.1, p. 16-19, 1998.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 588p.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2017/18, quarto levantamento. Brasília, v. 5, n. 4, Jan. 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_11_14_17_49_graos_4º_levantamento.pdf>. Acesso em 25 jan. 2018.

CHEN, J.; WILSON, T.M.A. Taxonomy of rigid rod-shaped viroses transmitted by fungi. **Agronomie**, v. 15, p. 421-426, 1995.

COLHOUN, J. Measurement of inoculum per seed and its relation to expression. **Seed Science and Technology**. Zurich, v.11, n. 2, p. 665-671, 1983.

COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 2017, Cascavel/PR. **Anais...**Cascavel,Coodetec. 363 p.

CUNHA, G. R.; CAIERÃO, E.; ROSA, A. C. **Informações Técnicas para o Trigo e Triticale – Safra 2016**. 9ª Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale. Passo Fundo, RS, 2015.

DALBOSCO, M.; SCHONS, J.; PRESTES, A. M. Incidência e índice de doença do mosaico do trigo em cereais de inverno e gramíneas de verão, associados ao *Polymyxa graminis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n.1, p. 48-52, 2002.

MORI, C. de. Aspectos Econômicos da Produção e Utilização. In: BÓREM, A.; SCHEEREN, P. L.; **Trigo: do plantio à colheita**. Passo Fundo: UFV, 2015. Cap. 1.

MORI, C. de. **Aspectos Comerciais e Econômicos do Trigo**. Cap. 16. 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140920/1/id43625-2016LVTrigoCap16.pdf>>. Acesso em 20 janeiro, 2018.

DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J. J.; CRUZ FILHO, J. Tratamento de sementes e controle de patógenos. **Imprensa Universitária**, Viçosa, 1980. 121 p.

DHINGRA, O. D. **Teoria da transmissão de patógeno fúngico por sementes**. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). Sementes: qualidade fitossanitária. Viçosa: UFV, 2005. p. 75-112.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, p. 11-15, 1987.

EMBRAPA, Empresa de Pesquisa Agropecuária Brasileira. **Trigo, cultivar BRS Guamirim**. Passo Fundo, 2005. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/trigo/busca-de-produtosprocessos-e-servicos>>. Acesso em 3 de fevereiro de 2018.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes.pt: **Experimental Designs package** (Portuguese). R package version 1.1.2. 2013.

GILMER, D., RATTI, C. ICTV Report consortium, ICTV virus taxonomy profile: *Benyviridae*, **Journal of General Virology**, v. 98, p. 1772-1572, 2017.

GWIRTZ, J. A.; WILLYARD, M. R.; MCFALL, K. L. W. **Wheat: more than just a plant**. In: MÜHLENCHMIE. Future of flour: a compendium of flour improvement.

2014. Disponível em: <http://muehlenchemie.de/downloads-future-of-flour/FoF_Kap_02.pdf> Acesso em: 05 de junho de 2018.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 18p e 52p.

HOSSEN, D. C.; CORRÊA JÚNIOR, E. S.; GUIMARÃES, S.; NUNES, U. R.; GALON, L. Tratamento químico de sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária**. Goiânia, v. 44, n. 1, p. 104-109, 2014.

HULL, R. **Plant Virology**. 5 ed. São Diego, Academic Press, 2013, 1118p.

ISHIKAWAI, M. S.; DE BATISTA, I. C.; IGARASHI, F. S. Tratamento químico de sementes sobre o desenvolvimento de mancha marrom em plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1341-1346, 2012.

JUNIOR, F. B. R.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Uso de Ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microorganismos do solo. **Documentos 51**. Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 33, 2002.

KANYUKA, K.; WARD, E.; ADAMS, M. J. *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. **Molecular Plant Pathology**, Londres, v.4 (5), p. 393-406, 2003.

KESSMANN, H.; RYALS, J.; STAUSB, T.; OOSTENDORP, M.; AHAGOY, P.; HOFFMANN, C. J.; FRIEDRICH, L.; DELANEY, T.; LAWTON, K.; RYALS, L.; WEYMANN, K.; LIGON, H.; VERNUIJ, B.; UKNES, S. Mode of action of new plant activator. In: International Plant Protection Congress, **Proceedings**. The Hague The Netherlands, p. 2-7, 1995.

KOENIG, R.; LESEMANN, D. E.; Genus *Benyvirus*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; Ball, L. A. (Eds.), **Virus Taxonomy**, Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, London, 2005, p. 1043-1048.

LARSEN, H. J., BRAKKE, M. K., LANGENBERG, W. G. Relationship between *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus*, disease resistance, and early growth of winter wheat. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, p. 857-862, 1985.

LAU, D. **Trigo: semeadura em solo encharcado pode favorecer o mosaico.** Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/24479187/trigo-semeadura-em-solo-encharcado-pode-favorecer-o-mosaico>>. Acesso em 23 de maio de 2018.

LAU, D. Viroses no ataque. **Cultivar Grandes Culturas.** 185 ed. p. 32-36, 2014.

LAU, D.; KUHMEN, P.; SILVA, F. N.; CASA, R. T.; FAJARDO, T. V. M.; RODRIGUES, O.; WESP, C. L.; FRANCO, F. A.; ZOLDAN, S.; PEREIRA, F. S.; VALENTE, J. B.; STEMPKOWSKI, L. A. Mosaico comum do trigo no Brasil. In: XI Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa do Trigo e Triticale. **Anais Resumos Expandidos**, Cascavel, p. 84-86, 2017.

LIMA, T. C.; MEDINA, P. F.; FANAN, S. Avaliação do vigor de trigo pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes.** Londrina, v. 28, n. 1, p. 106-113, 2006.

LITTLEFIELD, L. J.; WHALLON, J. H.; DOSS, P. J.; HASSAN, Z. M. Post infection development of *Polymyxa graminis* in roots of *Triticum aestivum*. **Mycologia**, New York, v. 90, p. 869-882, 1998.

LEDINGHAM, G. A. Studies on *Polymyxa graminis*, n. Gen. N. Sp., a plasmodiophoraceous root parasite of wheat. **Canadian Journal of Research.** Ottawa, v. 17, p. 40-51, 1939.

LEGREVE, A.; DELFOSSE, P.; MARAITE, H. Phylogenetic analysis of *Polymyxa* species based on nuclear 5.8S and internal transcribed spacers ribosomal DNA sequences. **Mycological Research.** Cambridge, v. 106, p.138-147, 2002.

LUCCA FILHO, O. A. Patologia de sementes. In.: PESKE, S.T.; LUCCA FILHO, O.A.; BARROS, A.C.S.A. **Sementes : fundamentos científicos e tecnológicos**, 2ª ed., 2006, 473p.

MACIEL, J. L. N.; MORAES, M. G.; ALMAÇA, M. A. K.; AIDA T. S. MATSUMURA & JOHANNES H. FALCADE. Ocorrência do Vírus *Rice stripe necrosis virus* em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 209, 2006.

MACHRY, C.; NICOLA, D.; ROSA, A.; JANDREY, J.; CARLET, L.; ZANUZZI, G.; NAVARINI, L. Diferentes tratamentos de semente no controle de *Polymyxa graminis* em trigo. **Anais Seminários Iniciação Científica**. Bento Gonçalves, RS, v. 5, nov. 2016.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina, ABRATES, cap.1, 1999, p.1-21.

MARCUZZO, L. L.; **Rizomania- Doença devastadora da beterraba**. Revista Campo e Negócios, 2016. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/rizomania-doenca-devastadora-da-beterraba>>. Acesso em 07 de maio de 2018.

MAR, T. B.; LAU, D.; SCHONS, J.; PEREIRA, P. R. V. S.; CARMINATTI, A. J. Identification and characterization of *Wheat Streak Mosaic Virus* Isolates in wheat-growing areas in Brazil. **International Journal of Agronomy**. Cairo, 2013. 6 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/983414>>. Acesso 3 de março de 2018.

MCKINNEY H. H. Investigation of the rosette disease of wheat and its control. **Journal Agriculture Residual**, v. 23, 1923, p. 771-800.

MEHTA, Y. R. **Doenças do trigo e seu controle**. São Paulo: Ceres, 1978, p. 190.

MENTEN, J. O. M. Importância do tratamento de sementes. In: MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991, p. 203-224.

MENTEN, J. O.; MORAES, M. H. D. Tratamento de sementes: históricos, tipos, Características e Benefício. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 20, n. 3, 2010.

MORALES, F. J., WARD, E., CASTAÑO, M., ARROYAVE, J. A., LOZANO, I., ADAMS, M. J. Emergence and partial characterization of Rice stripe necrosis virus and its fungus vector in South America. **European Journal of Plant Pathology**, 105, 643–650, 1999.

NASCIMENTO, W. M. O.; OLIVEIRA, B. J.; FAGIOLI, M.; SADER, R. Fitotoxicidade do inseticida carbofuran 350 FMC na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.18, n. 2, p. 242-245, 1996.

NETO, J. B. F.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T. Caracterização dos problemas de fitotoxicidade de plântulas de soja devido ao tratamento de sementes com fungicida Rhodiauram 500 sc, na safra 2000/01. **Documentos 149**, Embrapa Soja, Londrina, p. 19, 2000.

NYKAZA, S. M.; HEINE, E. G.; NIBLETT, C. L. Effects of *Wheat Soil-Borne Mosaic Virus* on several plant characters of winter wheat. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 63, p. 594-598, 1979.

ONU (Organização das Nações Unidas). **World Population Prospects**. United Nations Department of Economic and Social Affairs/Population Division World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. Nova York, 2017.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. **Doenças em cereais de inverno: aspectos epidemiológicos e controle**. Passo Fundo, 1995, 58p.

R Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em 16 de novembro de 2017.

REIS, E. M.; ZOLDAN, S. M.; GERMANO, B. C. **Controle de doenças da cultura e triticales safra 2016**. XIV Reunião da Comissão Brasileira do Trigo e Triticales. Passo Fundo, 2016.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Doenças dos cereais de inverno: diagnose, epidemiologia e controle**. 2ed. rev. Atual. Lages, Graphel, 2007, 176p.

REIS, E. M. & CASA, R. T. **Patologia de sementes de cereais de inverno**. Passo Fundo. Aldeia Norte. 1998. 88p.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Indicadores para o tratamento de sementes de trigo com fungicida**. Passo Fundo/RS, 2012. Disponível em: <<http://www.orsementes.com.br/sistema/anexos/artigos/24/Trat%20sementes%20trigo.pdf>> Acesso em 12 de março de 2018.

REIS, E. M. **Previsão de doenças de plantas**. Editora Universitária, Universidade de Passo Fundo, RS, p. 65-99, 2004.

RUGIERI, A. C. **Morfologia de gramíneas e leguminosas forrageiras**. São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/zootecnia/Aula_2_morfologia.pdf> Acesso em 4 de janeiro de 2018.

SOUZA, R.; SCHONS, J.; BRAMMER, S.; PRESTES, A.; SCEREN, P.; NICOLINI-TEIXEIRA, F.; CECCHETTI, D.; LANZARINI, A. C. Efeito do *Soil borne wheat mosaic virus* sobre o metabolismo de cinco genótipos de trigo com diferentes níveis de resistência a doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, 2005, p. 400-403.

SANTOS, H. A. A.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C.; DE MIO, L. L. M.; Controle de doenças do trigo com fosfitos e acinbenzolar-s-metil isoladamente ou associados a piraclostrobina+ epoxiconazole. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2 p. 433-442, 2011.

SCHEEREN, P. L.; CASTRO, R. L.; CAIERÃO, E. Botânica, morfologia e descrição fenotípica. **Trigo do plantio a colheita**. UFV, Viçosa, MG, cap. 2, p. 35-55, 2015.

SOLDATELLI, P.; CASA, R. T.; LIMA, A.; RIBEIRO, Y. C. K.; MARTINS, F. C. Survival, viability and control of *Alternaria* sp. in common bean seeds. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n.3, p. 193-198, 2017.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das Sementes: Tecnologia da Produção**. São Paulo. Ed. agronômica Ceres, 1977, 224p.

TYAGI, S.; SULTANA, R.; JU, H.; LEE, W.; KIM, K.; LEE, B.; LEE, K.; The development of simple methods for the maintenance and quantification of *Polymyxa graminis*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 482-490, 2016.

ULGUIM, A. R.; AGOSTINETTO, D.; MARTINI, A. T.; WESTENDORFF, N. R.; LANGARO, A. C. Características agronômicas do trigo em função do tratamento de sementes e épocas de aplicação de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 19, ns.1/2, p. 21-32, 2013.

USDA, United States Department of Agriculture. **Grain: World Markets and Trade**. 2017. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf>>. Acesso em 5 de maio de 2018.

WALSH, J. A. Chemical control of fungal vectors of plant viroses. The American Phytopathological Society. **Plant Virus Disease Control**. Minesota. 1998, p 196-207.

WARD E.; ADAMS M.J. Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus and species specific primers. **Mycologia Residual**, Cambridge, v. 102, p. 965–974, 1998.

WEISZ, R.; COWGER, C.; AMBROSE, G.; GARDNER, A.; Multiple Mid-Atlantic field experiments show no economic benefit to fungicide application when fungal disease is absent in winter wheat. Disease Control and Pest Management. **Phytopathology**, Saint Paul, v.101, n.3, p. 323-333, 2011.

WESP, C.L.; NAVARINI, L.; BRUINSMA, J.S.; SEIDEL, G. Efeito do tratamento químico de sementes no controle do vírus do mosaico comum do trigo. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. Londrina, **Anais**. Londrina IAPAR, 2012. 5 p.

XU, Y.; HU, L.; LI, L.; ZHANG, Y.; SUN B.; MENG X.; ZHU, T.; SUN, Z.; HONG, G.; CHEN, Y.; YAN, F.; YANG, J.; LI, J.; CHEN, J.; Ribotypes of *Polymyxa graminis* in Wheat Samples Infected with Soil-borne wheat viruses in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, n. 5 , p. 948-954, 2018.

ZERBINI, F. M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução à virologia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 145p. (Cadernos Didáticos; 87).