

## **Sanidade, transmissão e patogenicidade de fungos associados à sementes de *Chloroleucon tortum* mart. e *Plathymentia reticulata* benth.**

Layane Mourão Cordeiro<sup>1</sup>; Natália RisoFonseca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Layane Mourão Cordeiro, Bolsista IFMG, Bacharelado em Engenharia Florestal, IFMG Campus São João Evangelista, São João Evangelista- MG; layane.mourao.cordeiro@gmail.com

<sup>2</sup>Orientadora: Natália Riso Fonseca, IFMG campus São João Evangelista; natalia.fonseca@ifmg.edu.br

### **RESUMO**

Estudos sobre a associação entre fungos e sementes e a avaliação da sua capacidade patogênica é de fundamental importância para fornecer subsídios para coleta, armazenamento de sementes e produção de mudas. Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho avaliar a sanidade, a transmissão via semente e a patogenicidade de fungos associados às sementes de *Plathymentia reticulata* e *Chloroleucon tortum* armazenadas no banco de sementes do Instituto Federal de Minas Gerais - campus São João Evangelista, com o intuito de determinar a qualidade fitossanitária das mesmas para a produção de mudas pelo viveiro do campus. Para isso, as sementes das duas espécies foram submetidas ao teste de sanidade pelo método de papel-filtro (Blotter-test), teste de transmissão via sementes e ao teste de patogenicidade. Os fungos *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. Foram identificados no teste de sanidade. No teste de transmissão, *Fusarium* sp. foi detectado nas sementes de *C. tortum* associado a sintomas de tombamento de pré e pós-emergência e lesões nos cotilédones e raízes das plântulas. A capacidade patogênica do fungo foi confirmada através do teste de patogenicidade em sementes sadias de *C. tortum*, utilizando um isolado de *Fusarium* sp. obtido no teste de transmissão. Os sintomas de manchas em raízes, apodrecimento de colo e cotilédones, além de baixa taxa de germinação foram observados, confirmando dessa forma a capacidade do isolado de *Fusarium* sp. ser transmitido através de sementes contaminadas e causar danos à germinação e ao crescimento das plântulas.

**Palavras-chave:** patogenicidade; sanidade; transmissão; sementes florestais; fungo.

### **INTRODUÇÃO:**

As sementes de espécies florestais são primordiais no setor florestal brasileiro devido, entre outros fatores, ao aumento da demanda destas em diversos programas, como recuperação de áreas degradadas e projetos de arborização e paisagismo. No entanto, a qualidade fitossanitária é um fator primordial na produção de mudas por sementes, visto que a presença de micro-organismos patogênicos pode causar deterioração das sementes e lesões nas plântulas, gerando prejuízos quantitativos e qualitativos (NETTO e FAIAD, 1995).

Os patógenos podem se associar as sementes por três formas diferentes: aderidos externamente, localizados internamente e, acompanhando a semente (SANTOS & PARISI, 2015), sendo que os fungos são os principais patógenos causadores de danos quando associados às sementes, causando sintomas de tombamento de pré e pós-emergência, die-back e lesões em raízes e cotilédones.

Estudos sobre a associação de fungos em sementes e a avaliação da sua capacidade patogênica são de fundamental importância para fornecer subsídios para a coleta e armazenamento adequado de

sementes, a fim de se obter mudas saudáveis e vigorosas (SANTOS et.al., 1997). Para isso, é necessária a realização de testes para se conhecer a qualidade sanitária das sementes, como o teste de sanidade (LAZAROTTO, 2010).

A espécie florestal *Chloroleucontortum* (Mart.) Barneby & J. W. Grimes, conhecida popularmente como vinhático-de-espinho, é uma árvore ornamental, apropriada para o paisagismo e favorável para plantios em áreas degradadas (LORENZI, 2002). *Plathymenia reticulata* Benth., conhecida por vinhático-branco possui, além das mesmas finalidades que *C. tortum*, potencial para produção de madeira serrada e roliça, energia e sombreamento de pastagens (CARVALHO, 2009).

Dessa forma, o projeto objetivou avaliar a sanidade, a capacidade de transmissão via semente e a patogenicidade de fungos associados às sementes de *P. reticulata* e *C. tortum* armazenadas no banco de sementes do IFMG - Campus São João Evangelista com o intuito de determinar a qualidade fitossanitária das sementes armazenadas no local para a produção de mudas pelo viveiro do campus.

#### **METODOLOGIA:**

As amostras de sementes de *C. tortum* e *P. reticulata* foram obtidas do banco de sementes do IFMG - campus São João Evangelista. As sementes estavam acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria (temperatura entre 5 a 10 °C), com baixa umidade relativa do ar. As sementes haviam sido coletadas em setembro de 2017, de árvores matrizes localizadas no próprio campus. As análises foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia do IFMG-SJE.

Para a realização do teste de sanidade foi utilizado o método do papel-filtro ou *Blotter-test* com uma amostra de 200 sementes de cada espécie, divididas em duas parcelas. Em uma das parcelas foi feita a desinfestação das sementes, imergindo-as em hipoclorito de sódio (NaCl 1%) por 2 minutos, de acordo com metodologia descrita por Parisi & Santos (2015), e na outra parcela não foi realizado nenhum tipo de desinfestação.

O teste consistiu em dispor as sementes de cada parcela em caixas do tipo Gerbox, subdivididas em cinco repetições (caixas) contendo 20 sementes cada. As caixas utilizadas foram previamente desinfestadas com álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio (NaCl 1%) por 2 minutos, lavadas e forradas com duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada até a saturação. As caixas com as sementes foram incubadas em câmara de germinação tipo B.O.D. com temperatura controlada a 20°C ± 2°C, sob luz fluorescente, com fotoperíodo de 12 horas, por um período de sete dias até o surgimento das estruturas fúngicas. A avaliação da incidência e a identificação dos fungos foram realizadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico e um microscópio ótico. Os potenciais fungos fitopatogênicos foram isolados diretamente em placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar).

Previamente ao teste de sanidade, foi realizado um teste preliminar para avaliar a germinação das sementes, onde a espécie *C. tortum*, apresentou rápida germinação. A fim de evitar problemas durante a avaliação do teste de sanidade, como abertura da tampa da caixa gerbox, as sementes da espécie tiveram que ser submetidas a um processo de inibição de germinação por congelamento, logo após a montagem do experimento. Para isso, as caixas contendo as sementes da espécie foram mantidas por 24 horas à

temperatura de incubação mencionada anteriormente e, após esse período, foram transferidas para o congelador à  $-18^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, sendo em seguida, novamente levadas para a B.O.D até completar o período determinado.

No teste de transmissão, foram semeadas 100 sementes não desinfestadas de cada uma das espécies, divididas em quatro repetições de 25 sementes. As sementes foram semeadas individualmente em bandejas de plástico contendo 100 células individuais, previamente esterilizadas por imersão em hipoclorito de sódio 1% durante 24 horas, utilizando areia autoclavada como substrato. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura ambiente e irrigação por aspersão.

Foram feitas avaliações diárias por 22 dias, tempo em que cessou a germinação das sementes de ambas as espécies, sendo que nestas avaliações, contou-se o número de plântulas normais e de plântulas com sintomas de doença. As plântulas com sintomas foram avaliadas em microscópio estereoscópio em busca de estruturas de micro-organismos. Os potenciais fungos fitopatogênicos foram isolados diretamente em placas de Petri contendo meio BDA. As sementes não germinadas foram retiradas das bandejas, lavadas com água esterilizada e colocadas, sem desinfestação, em placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar) suplementado com o antibiótico rifamicina sódica (10 mg/mL), para reduzir o crescimento de bactérias e favorecer o crescimento de colônias fúngicas.

Para o teste de patogenicidade, os isolados de fungos fitopatogênicos encontrados tanto nos testes de sanidade e transmissão foram repicados para novas placas contendo BDA e antibiótico e estas foram incubadas em B.O.D. a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com 12 horas de fotoperíodo até o crescimento dos fungos.

A inoculação das sementes com os isolados fúngicos potencialmente fitopatogênicos foi realizada pelo método de contato com a cultura fúngica. Anteriormente à inoculação, as sementes foram desinfestadas com álcool 70% (30 segundos) e hipoclorito de sódio 1% (2 minutos), lavadas em água destilada esterilizada e deixadas secar sobre papel filtro esterilizado. Posteriormente, as sementes foram colocadas em contato com a cultura fúngica obtida nas placas contendo meio BDA. Como testemunha, sementes desinfestadas foram colocadas em placas contendo apenas meio BDA. As placas foram mantidas durante 24 horas em B.O.D. a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com 12 horas de fotoperíodo. Após este período, as sementes inoculadas foram semeadas em bandejas de plástico, previamente esterilizadas, contendo 100 células individuais e areia autoclavada como substrato, com uma semente por célula. Foram semeadas quatro repetições de 25 sementes. As bandejas foram mantidas na casa de vegetação, sob irrigação diária.

As avaliações foram realizadas semanalmente através da contagem de plântulas emergidas e ao final foram obtidas a porcentagem de plântulas normais (PN) e a porcentagem de plântulas com sintomas (PS). As plântulas sintomáticas foram retiradas e colocadas em placas de Petri, contendo meio BDA suplementado com antibiótico e mantidas em B.O.D com temperatura controlada a  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob luz fluorescente, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, a fim de reisolar o patógeno associado.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES:**

A partir dos resultados obtidos no teste de sanidade, evidenciou-se que as sementes das duas espécies florestais, não desinfestadas (ND), apresentaram maior número de sementes contaminadas, comprovando a eficácia da metodologia utilizada para desinfestação. Verificou-se também que as sementes

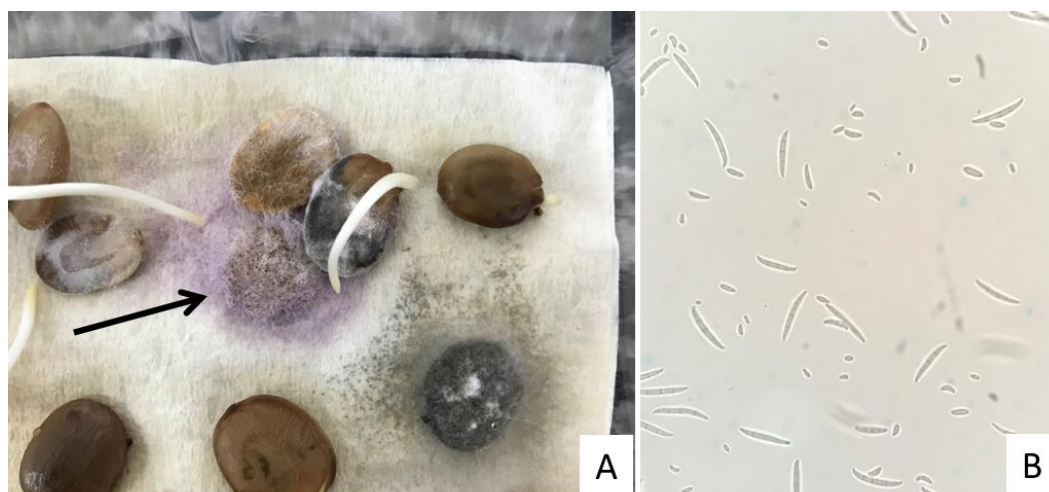
da espécie *P. reticulata*, em geral, apresentaram uma baixa capacidade de germinação em relação a espécie *C. tortum*, mesmo quando não contaminadas por fungos (Tabela 1). As sementes da espécie *P. reticulata*, segundo Lorenzi (2002), assim que coletadas devem ser semeadas e, como as sementes utilizadas estavam armazenadas em câmara fria, isso pode ter influenciado negativamente na germinação das sementes.

**Tabela 1.** Germinação e incidência de fungos nas amostras analisadas de *P. reticulata* e *C. tortum*, desinfestadas (D) e não desinfestadas (ND).

Amostra	Porcentagem de germinação	Incidência de fungos
<i>P. reticulata</i> (ND)	0%	83%
<i>P. reticulata</i> (D)	2%	20%
<i>C. tortum</i> (ND)	49%	77%
<i>C. tortum</i> (D)	47%	24%

Ao realizar a identificação dos patógenos presentes, verificou-se intensa colonização das sementes por bactérias, com e sem desinfestação. No entanto, as mesmas não foram foco de identificação nesse trabalho. Na espécie *C. tortum* foram identificados, com base na morfologia de suas estruturas vegetativas e reprodutivas, os gêneros *Fusarium* sp. (Figura 1), *Pestalotiopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. Já nas sementes da amostra de *P. reticulata* foram encontrados apenas os gêneros *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.

Fungos do gênero *Rhizopus* e *Aspergillus* foram eficientemente eliminados após o processo de assepsia empregado nesse trabalho, não sendo encontrado nas sementes desinfestadas de ambas as espécies florestais.



**Figura 1.** A) Semente de *C. tortum* contaminada por colônia do fungo fitopatogênico *Fusarium* sp. (indicado pela seta). B) Macroconídios e microconídios de *Fusarium* sp. (aumento de 40x). Fotos: Natália R. Fonseca.

SANTOS et al. (2015) relataram que os gêneros de fungos *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus* são comumente encontrados em sementes florestais, o que evidencia-se no presente trabalho com a presença dos mesmos nas espécies florestais trabalhadas. CARNEIRO (1990) ao analisar a qualidade sanitária de



sementes de onze espécies florestais na região de Paraopeba-MG também identificou os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* na espécie *P. reticulata* através do teste de sanidade.

No teste de transmissão, foi verificado que as sementes de *P. reticulata* e *C. tortum* começaram a germinar no quarto e quinto dia após semeadura, respectivamente. Ao final do teste, observou-se que as sementes de *C. tortum* germinaram em maior quantidade em relação as sementes de *P. reticulata*, e também apresentaram maior número de plântulas sintomáticas (Tabela 2). Os sintomas apresentados pelas plântulas de *C. tortum* foram má formação e lesões necróticas em raízes, além de amarelecimento, lesões nas bordas e queda de cotilédones (Figura 2). Já na espécie *P. reticulata*, as plântulas da espécie que emergiram e estavam danificadas, apresentavam sintomas de queima das bordas e queda de cotilédone, além de má formação do caule. As sementes não germinadas da espécie apresentavam podridão e intensa colonização por bactérias, o que não permitiu que as mesmas germinassem.

**Tabela 2.** Porcentagem de plântulas normais, plântulas sintomáticas e sementes não germinadas durante o teste de transmissão.

	Porcentagem de plântulas normais (%)	Porcentagem de plântulas sintomáticas (%)	Porcentagem de sementes não germinadas (%)
<i>P. reticulata</i>	15	8	77
<i>C. tortum</i>	45	18	37



**Figura 2.** A) Plântula com sintoma de amarelecimento e queima de cotilédone (seta). B) Plântulas com diversos sintomas ocasionados pela presença do patógeno, como má formação de plântula e raízes, amarelecimento e lesões nos bordos de cotilédones e raízes. Foto: Layane M. Cordeiro.

Ao avaliar as plântulas sintomáticas, para ambas as espécies florestais, foi identificado com maior frequência, o fungo do gênero *Fusarium* sp. BOTELHO et al. (2008), também afirmaram em seu trabalho que os gêneros *Alternaria*, *Phoma*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Phomopsis*, presentes em sementes de ipê-amarelo e ipê-roxo, possuíam a capacidade de causar sintomas de manchas em raízes. Segundo trabalho realizado por Lazarotto et al. (2012), o *Fusarium* sp. foi capaz de ser transmitido via semente para a VIII Seminário de Iniciação Científica do IFMG – 12 a 14 de agosto de 2019, Campus Ribeirão das Neves.

plântula. Os mesmos autores também verificaram que a amostra que obteve maior média de sementes não germinadas e apresentavam sintomas de apodrecimento das raízes, colo e cotilédones apresentaram a presença do patógeno.

Como nos testes de sanidade e de transmissão, a espécie florestal *P. reticulata* apresentou baixo índice de germinação, optou-se por trabalhar apenas com as sementes da espécie *C. tortum* no teste de patogenicidade. Como o fungo mais comumente encontrado causando danos nas sementes e confirmado ser passível de transmissão foi o gênero *Fusarium* sp., o mesmo foi selecionado para ser inoculado nas sementes para realização do teste de patogenicidade.

Como resultado do teste de patogenicidade, 20% das plântulas emergidas a partir das sementes inoculadas de *C. tortum* apresentaram-se sintomáticas. As sementes não germinadas representaram 69%, sendo que apenas 11% das plântulas apresentaram crescimento e morfologia normais. O número de sementes não germinadas, em relação ao teste de transmissão, foi muito superior, mostrando a ação do fungo *Fusarium* sp. e a efetividade do teste de patogenicidade.

As plântulas sintomáticas do teste de patogenicidade, apresentaram sintomas característicos ocasionados pelo gênero *Fusarium*, como manchas nas raízes, baixa germinação (BOTELHO et. al, 2008), além de apodrecimento de colo e cotilédones (LAZAROTTO et. al, 2012). Segundo Ferreira (1989), algumas espécies de *Fusarium* têm sido relatadas causando tombamento em pré ou pós-emergência de plântulas de espécies florestais, sendo problema comum em sementes florestais.

## CONCLUSÕES:

Os métodos utilizados nesse trabalho para o teste de sanidade, transmissão e patogenicidade foram eficazes para a detecção de fungos e associação com sintomas ocasionados em sementes e plântulas;

A metodologia utilizada para inibição da germinação precoce e a desinfestação das sementes obtiveram resultados satisfatórios;

O fungo *Fusarium* sp. é transmitido para as plântulas de *C. tortum* via semente, causando tombamento pré- e pós-emergente e sintomas nas raízes, caules e cotilédones;

As sementes das espécies *C. tortum* e *P. reticulata* armazenadas na câmara fria localizada no viveiro de mudas do Instituto Federal de Minas Gerais- Campus São João Evangelista, não apresentaram qualidade fitossanitária e fisiológica adequadas, podendo haver prejuízos no desenvolvimento da planta e redução no número de plantas a serem obtidas a partir da semeadura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BOTELHO, L.S.; MORAES, M.H.D., MENTEN, J.O.M. **Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, germinação e transmissão de sementes.** Summa Phytopathologica, v.34, n.4, p.343-348, 2008.

CARNEIRO, J.S. **Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paraopeba, MG.** Fitopatologia Brasileira, v. 15, p.75-76, 1990.

CARVALHO, P.E.R. **Vinhático: *Plathymentia reticulata*.** Comunicado Técnico Embrapa. Colombo: Embrapa Florestas, 2009. 11p.

FERREIRA, F.A. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: **Sociedade de Investigações Florestais**, 1989.

LAZAROTTO, M. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cedro e patogenicidade de *Rhizoctonia spp.*** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, 90p, 2010.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M.F.B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A.F. dos.; MACIEL, C.G.; LONGHI, S.J. **Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região sul do Brasil.** Ciência Florestal, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, jul.-set., 2012.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas do Brasil.** 1 v. 4 ed. Nova Odessa, Plantarum, 2002. 290 p.

NETTO, D.A.M.; FAIAD, M.G.R. **Viabilidade e Sanidade de Sementes de Espécies Florestais.** Revista Brasileira de Sementes, vol. 17, n 1, p. 75-80, 1995.

PARISI, J.J.D. & SANTOS, A.F. DOS. **Métodos convencionais de detecção de fungos em sementes.** In: SANTOS, A.F, PARISI, J.J.D, MENTEN, J.O.M. Patologia de sementes florestais. EMBRAPA FLORESTAS. Colombo, PR. 2015. 236 p.

SANTOS, A.F. DOS; PARISI, J.J.D. **Doenças em mudas e tipos de associações entre fungos e sementes florestais.** In: SANTOS, A.F, PARISI, J.J.D, MENTEN, J.O.M. Patologia de sementes florestais. EMBRAPA FLORESTAS. Colombo, PR. 2015. 236 p.

SANTOS, M.F.; RIBEIRO, W.R.C.; FAIAD, M.G.R.; SANO, S.M. Fungos associados às sementes de baru (*Dipterysalata*Vog). **Revista Brasileira de Sementes**, v.19, n.1, p. 135-139. 1997.