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

Interferência de fungos na qualidade das sementes de
Solanum granulosoleprosum e *Senna alata*

Evelyn Fernandes de Araujo Koch

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2019

Evelyn Fernandes de Araujo Koch
Engenheira Agrônoma

Interferência de fungos na qualidade das sementes de
Solanum granulosoleprosum e *Senna alata*

Orientador:
Profa. Dra. **ANA DIONISIA DA LUZ COELHO NOVEMBRE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Koch, Evelyn Fernandes de Araujo

Interferência de fungos na qualidade das sementes de *Solanum granulosoleprosum* e *Senna alata* / Evelyn Fernandes de Araujo Koch - - Piracicaba, 2019.

119 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fedegoso gigante 2. Fumo bravo 3. Análise de sementes 4. Espécies florestais I. Título

Aos meus pais

José e Rosefy

Por me ensinarem os valores
da dignidade, da determinação
e de uma Família

Dedico

Ao meu esposo querido *Paulo*

por ter embarcado comigo em mais este projeto
pelo amor, incentivo e companheirismo de todas as horas

e aos meus filhos *Clara e Otto*,

meus grandes amigos, incentivadores
e as sementes de melhor qualidade que eu já produzi

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela energia de todos os dias.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), através do Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade valiosa de realizar o Curso de Doutorado.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre, agradeço pela amizade, confiança, oportunidade, ensinamentos, orientação e por me conduzir ao “universo das sementes nativas”

Às queridas Maria Heloísa Durate de Moreas (Helô) e Helena C. Pescarin Chamma, pelo convívio nos Laboratórios de Patologia e de Análise de Sementes, pelos ensinamentos, carinho, colaboração, paciência, amizade e pelo exemplo de profissionalismo;

Aos docentes dos PPGs de Fitotecnia e Fitopatologia, responsáveis pela transmissão de conhecimentos que enriqueceram a minha formação.

Ao Prof. Dr. José Otávio Machado Menten pelas sugestões valiosas no início deste trabalho, pela amizade e por me apoiar numa das etapas mais difíceis, quando parte das informações deste trabalho foram furtadas.

Às preciosas estagiárias, que valem ouro, Larissa Gimenez , Poliana Frigo (Poli) e Mariana Colli (Mari), elementos fundamentais na condução das análises.

À equipe de profissionais do Viveiro Bioflora, pela cessão das sementes de fumo bravo, pela disponibilização de parte da sua estrutura e pelo auxílio na condução dos ensaios.

Ao colega Ricardo Harakawa, do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico, SP pelo auxílio na condução das análises para caracterização das espécies fúngicas desta pesquisa.

Ao Prof. José da Cruz Machado, da UFLA , pelas sugestões relativas à transmissão de *Fusarium*;

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Análise de Sementes, Adilson Teixeira, Davi Ulrich, Francisco Guilhien Gomes, João Elias Jabur e Luis Claudio Sousa, pela contribuição para a realização deste trabalho e pelos momentos de descontração durante estes anos.

Aos coletores de sementes Hélio das Graças de Oliveira (*in memoriam*) e Silvia R. Vasca de Oliveira pelo auxílio na obtenção das sementes recém colhidas de *Senna alata* utilizadas nesta pesquisa.

Aos colegas da Biblioteca Eliana Garcia, Ronaldo Caprecci, Alex D.de Oliveira e Lucio, pelo apoio, atenção e cordialidade;

À secretária do Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Luciane Toledo, pela atenção e auxílio;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Aos colegas dos Laboratórios de Patologia e de Análise de Sementes e da Pós Graduação em Fitotecnia Aline Neves, Ana Dognini, Bruna Longatti, Bruno Cardillo, Carina Oliveira, Danielle Castan, Fabio Diniz, Gabriela Fargoni, Gressa Chinelato, Haynna Abud, Ju Ferreira, Maria Beatriz Piedade, Maicon Javorski, Mayara Rodrigues, Larissa Chamma, Rafaela Zázera e Vitória Macedo pela convivência, apoio e trocas de experiências durante o doutorado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, com palavras, com gestos ou com um simples sorriso.... a minha gratidão.

“O tempo muito me ensinou:

ensinou a amar a vida,

não desistir de lutar,

renascer na derrota,

renunciar às palavras e pensamentos negativos,

acreditar nos valores humanos,

e a ser otimista.

Aprendi que mais vale tentar do que recuar...

Antes acreditar do que duvidar,

que o que vale na vida, não é o ponto de partida

e sim a nossa caminhada.”

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 TEMPERATURA E PERÍODO DE INCUBAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE <i>Senna alata</i> E <i>Solanum granulosoleprosum</i>.....	15
Resumo.....	15
Abstract	15
2.1 Introdução.....	16
2.2 Material e Métodos.....	20
2.3 Resultados e Discussão.....	21
2.4 Conclusões.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
3 MÉTODO PARA A GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Solanum granulosoleprosum</i>.....	35
Resumo.....	35
Abstract	35
3.1 Introdução.....	36
3.2 Material e Métodos.....	40
3.2.1 Sementes Utilizadas.....	40
3.2.2 Avaliação da Temperatura e da Luz.....	40
3.2.3 Avaliação da Posição das Sementes no Substrato.....	41
3.2.4 Avaliação da Utilização do Nitrato de Potássio (KNO ₃).....	41
3.3 Resultados e Discussão.....	42
3.3.1 Avaliação da Temperatura e da Luz.....	43
3.3.2 Avaliação da Posição das Sementes no Substrato.....	46
3.3.3 Avaliação da Utilização do Nitrato de Potássio (KNO ₃).....	49
3.4 Conclusões.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
4 INTERFERÊNCIA DE FUNGOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS NA QUALIDADE DAS SEMENTES DE <i>Senna alata</i>.....	59
Resumo.....	59
Abstract.....	59
4.1 Introdução.....	60
4.2 Material e Métodos.....	63
4.2.1 Sementes Utilizadas.....	63
4.2.2 Obtenção dos Isolados.....	64
4.2.3 Superação da Dormência.....	65
4.2.4 Inoculação das Sementes.....	65
4.2.5 Análises em Laboratório e em Casa de Vegetação.....	66
4.2.6 Verificação da Transmissão dos Fungos Associados às Sementes.....	67
4.3 Resultados e Discussão.....	68

4.3.1 Determinação do Teor de Água das Sementes.....	68
4.3.2 Testes de Sanidade.....	70
4.3.3 Análises de Germinação.....	75
4.3.4 Testes de Emergência.....	80
4.3.5 Verificação da Transmissão dos Fungos Associados às Sementes.....	82
4.4 Conclusões.....	85
REFERÊNCIAS.....	85
5 INTERFERÊNCIA DE <i>Fusarium</i> DO COMPLEXO DE ESPÉCIES <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC) NA QUALIDADE DAS SEMENTES DE <i>Solanum granulosoleprosum</i>.....	95
Resumo.....	95
Abstract.....	95
5.1 Introdução.....	96
5.2 Material e Métodos.....	99
5.2.1 Sementes Utilizadas.....	99
5.2.2 Obtenção dos Isolados.....	99
5.2.3 Inoculação das Sementes.....	100
5.2.4 Análises em Laboratório.....	101
5.2.5 Verificação da Transmissão dos Fungos Associados às Sementes.....	102
5.3 Resultados e Discussão.....	103
5.3.1 Determinação do Teor de Água das Sementes.....	103
5.3.2 Testes de Sanidade.....	104
5.3.3 Testes de Germinação.....	108
5.3.4 Verificação da Transmissão dos Fungos Associados às Sementes.....	110
5.4 Conclusões.....	112
REFERÊNCIAS.....	113

RESUMO

Interferência de fungos na qualidade das sementes de *Solanum granulosoleprosum* e *Senna alata*

O aumento da demanda por espécies brasileiras tem sido expressivo nos últimos anos, em função do interesse em recuperação de áreas degradadas e recomposição da paisagem. No entanto, para otimizar a utilização do insumo básico para a produção de mudas, a semente, ainda restam lacunas a serem preenchidas no tocante à qualidade de algumas espécies, dentre elas *Solanum granulosoleprosum* e *Senna alata*. Este estudo foi dividido em quatro capítulos. O primeiro teve a finalidade de pesquisar condições de temperatura aliadas ao período de incubação que fossem mais adequadas à detecção de fungos associados às sementes das duas espécies estudadas. O segundo objetivou avaliar a interferência da luz, da temperatura, da posição das sementes no substrato papel e do nitrato de potássio na germinação de sementes de *S. granulosoleprosum*, visando à recomendação de um método a ser utilizado na avaliação da germinação desta espécie. No terceiro foi verificada a interferência dos fungos *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC) na qualidade das sementes de *S. alata*, bem como a transmissão e sobrevivência destes, quando inoculados nas sementes através da técnica de restrição hídrica e no quarto verificou-se a interferência do fungo *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) na qualidade das sementes de *S. granulosoleprosum*, bem como sua transmissão e sobrevivência, quando inoculado em sementes, através da técnica de restrição hídrica. Os resultados demonstram que o método do papel de filtro, incubado sob temperaturas de 25°C, 7 ou 10 dias e 25°C, 10 dias é eficiente para a detecção de fungos associados às sementes de *S. granulosoleprosum* e *S. alata*, respectivamente. Foram identificados dois gêneros de fungos potencialmente patogênicos: *Alternaria* sp em *S. alata* e *Fusarium* sp, para as duas espécies estudadas. A alternância de temperatura 20-30°C, com semeadura entre papel e sobre papel, assim como a alternância a 15-35°C com semeadura sobre papel, aliados ao fotoperíodo de 8 horas e à utilização de solução de KNO₃ a 0,2% para umedecimento do substrato são condições propícias para o teste de germinação das sementes de fumo bravo. A técnica de restrição hídrica possibilita a inoculação de fungos nas sementes de *S. granulosoleprosum* e *S. alata*. Os fungos *A. alternata*, *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC) interferem na germinação e emergência da plântula, permanecem em associação com as sementes de *S. alata* durante o armazenamento e são transmitidos pelas sementes causando morte de sementes, necrose da raiz, estrangulamento do colo das plântulas e tombamento. *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) não causa interferência na germinação das sementes de *S. granulosoleprosum* inoculadas, tem a incidência reduzida ao longo do armazenamento, porém é transmitido para as plântulas causando morte de sementes, plântulas com

cotilédone preso pelo tegumento, estrangulamento do hipocótilo, má formação de raiz, hipocótilo com encharcamento e necrose nos cotilédones.

Palavras-chave: Fedegoso gigante; Fumo bravo; Análise de sementes; Espécies florestais

ABSTRACT

Fungi interference on seed quality of *Solanum granulosoleprosum* and *Senna alata*

The increased demand for Brazilian species has been expressive in the last years, due to the interest in recovery of degraded areas and recomposition of the landscape. However, to optimize the use of the basic input for seedling production, there are still gaps to be filled concerning seed quality of some species, such as *Solanum granulosoleprosum* and *Senna alata*. This research was divided into four chapters. The first one had the purpose of investigating temperature conditions allied to the incubation period that were more suitable for detection of fungi associated to the seeds of both species studied. The second focused on evaluating the influence of light, temperature, seed position on paper substrates and potassium nitrate on the germination of *S. granulosoleprosum* seeds, in order to recommend a method for testing germination of this species. On the third chapter the interference of the fungi *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium* belonging to the complex of species *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) and *Fusarium pseudocircinatum* (FPC), on the quality of *S. alata* seeds was checked, as well as their transmission and survival on the seeds when inoculated by means of water restriction technique. On the fourth one the interference of (FIESC) on the quality of *S. granulosoleprosum* seeds, was tested, as well as its transmission and survival, when inoculated in seeds, through the water restriction technique. The results showed that the blotter test method, incubated at 25°C, 7 or 10 days and 25°C, 10 dias, were more favorable for the detection of fungi associated with *S. granulosoleprosum* and *S. alata* seeds, respectively. Two genera of potentially pathogenic fungi were identified: *Alternaria* sp in *S. alata* and *Fusarium* sp, for both species studied. The temperature alternation between 20-30 ° C, with sowing between paper and on top of paper, as well as the alternation at 15-35 ° C with sowing on top of paper, under photoperiod of 8 hours and the use of 0.2 % KNO₃ solution for substrate wetting are suitable conditions for testing the germination of *S. granulosoleprosum* seeds. The water restriction technique provided inoculated seeds of *S. granulosoleprosum* and *S. alata*. The fungi *A. alternata*, *Fusarium* of the *incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) and *Fusarium pseudocircinatum* (FPC) interfere on the germination and emergence of the seedlings, remain in association with *Senna alata* seeds during storage period and were transmitted by seeds causing seed death, root necrosis, hypocotyl constriction followed by damping off. On the other hand, *Fusarium* of the *incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) does not interfere on germination of the inoculated *S. granulosoleprosum* seeds, has the incidence decreased during storage, however, is transmitted from seeds to seedlings causing seed death, seedlings with cotyledons trapped by the seed coat, hypocotyl strangulation, root malformation, hypocotyl with watersoaking and necrosis on cotyledons.

Keywords: Giant fedegoso; Wild smoke; Seed analysis; Forest species

1. INTRODUÇÃO

As espécies nativas brasileiras assumem cada vez mais um papel de importância quando se discute o presente e o futuro do ecossistema do nosso país. A reconstituição, preservação e conservação de diferentes biomas requerem a utilização destas espécies, adaptadas às condições edafoclimáticas das diversas regiões, buscando um equilíbrio próximo ao originalmente existente.

Para que estas plantas possam desempenhar seu papel nos âmbitos social, ambiental e econômico é imprescindível conhecer os fatores e as condições que afetam a qualidade das sementes, elemento primário para o início de qualquer atividade nestas áreas.

Distintamente das grandes culturas, as espécies nativas apresentam grande variabilidade genética e distribuição em ampla extensão geográfica. Fatores como local e época de produção, manejo de coleta e pós coleta, condições de armazenamento e incidência de fungos podem influenciar na qualidade das sementes obtidas. No entanto, em alguns casos, as informações sobre como realizar as análises de sementes destas espécies são limitadas, impossibilitando caracterizar os parâmetros físicos, fisiológicos e sanitários e adotar medidas pertinentes a cada situação.

O estabelecimento de métodos apropriados para expressar a qualidade e os estudos que visem verificar a interferência de fungos potencialmente patogênicos na qualidade de sementes são relevantes neste processo. Através de resultados consistentes, será possível agregar valor ao segmento, por meio da adoção de boas práticas de produção de sementes nativas e manejo de mudas em viveiros, contribuindo, assim, para um melhor aproveitamento do potencial das sementes e o aumento da capacidade de estabelecimento e desenvolvimento das plantas.

Neste contexto, esta pesquisa procurou elucidar alguns aspectos referentes à avaliação da qualidade das sementes de duas espécies nativas, *Solanum granulosoleprosum* e *Senna alata*, utilizadas atualmente como espécies de recobrimento em programas de restauração florestal. Para tanto, no capítulo 1, foram avaliados condições de temperatura e período de incubação, que fossem mais adequados à detecção de fungos associados às sementes destas duas espécies. No capítulo 2, para propor um método a ser utilizado na avaliação da germinação de *S. granulosoleprosum*, foram estudadas diferentes temperaturas

na presença e ausência de luz, posição das sementes no substrato papel e a utilização de nitrato de potássio para o umedecimento do substrato. No capítulo 3 foi verificada a interferência dos fungos *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC), na qualidade das sementes de *S. alata*, bem como sua transmissão e sobrevivência, quando inoculados nas sementes através da técnica de restrição hídrica. No capítulo 4 foi estudada a interferência do fungo *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) na qualidade das sementes de *S. granulosoleprosum*, bem como sua transmissão e sobrevivência, quando inoculado nas sementes através da técnica de restrição hídrica.

2 TEMPERATURA E PERÍODO DE INCUBAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE *Senna alata* E *Solanum granulosoleprosum*

Resumo

A sanidade das sementes é geralmente avaliada por métodos estabelecidos para as sementes de ambiente temperado, havendo restrição de estudos para as de ambiente tropical, especialmente para as espécies brasileiras, como fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*) e fedegoso gigante (*Senna alata*). Assim, nesta pesquisa foram avaliadas as condições de temperatura (20, 25 e 28°C) aliadas ao período de incubação (5, 7 e 10 dias após semeadura), utilizando o método do papel de filtro, que fossem mais adequadas à detecção de fungos associados às sementes destas espécies. Há a detecção de fungos potencialmente patogênicos associados às sementes de *Solanum granulosoleprosum* por meio do método do papel de filtro, com incubação a 25°C por 7 ou 10 dias, e às sementes de *Senna alata* por meio do método do papel de filtro, com incubação a 25°C por 10 dias. Foram identificados dois gêneros de fungo de campo potencialmente patogênicos: *Alternaria* sp. em *Senna alata* e *Fusarium* sp. para as sementes das duas espécies estudadas, além dos fungos de armazenamento *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., em sementes de *Solanum granulosoleprosum*.

Palavras-chave: Sanidade; Sementes nativas; Fumo bravo; Fedegoso gigante

Abstract

Seed health is usually evaluated by methods established for temperate seeds, with studies restricted to those from tropical environment, especially for Brazilian species, such as wild tobacco (*Solanum granulosoleprosum*) and giant fedegoso (*Senna alata*). Thus, in this research were evaluated the temperature conditions (20, 25 and 28°C) allied to the incubation periods (5, 7 and 10 days after sowing) using the blotter test method, which could be more suitable for detection of fungi associated with the seeds of these species. There is the detection of potentially pathogenic fungi associated with the seeds of *Solanum granulosoleprosum* by means of the blotter test method, with incubation at 25°C for 7 or 10 days, and with seeds of *Senna alata* by means of the blotter test method, incubated at 25°C for 10 days. Two potentially pathogenic field fungus genera were identified: *Alternaria* sp. in *Senna alata* and *Fusarium* sp. for both species studied, besides the storage fungi *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., on seeds of *Solanum granulosoleprosum*.

Keywords: Seed health; Native seeds; Wild tobacco; Giant fedegoso

2.1 INTRODUÇÃO

O estabelecimento de Programas de Recuperação de Áreas Degradadas requer sementes provenientes de plantas de diversas espécies e com variabilidade. Neste contexto, a qualidade das sementes, definida pelos parâmetros genético, físico, fisiológico e sanitário é importante, pois a obtenção de plantas saudáveis, dependerá das mudas que serão formadas a partir dessas sementes.

A associação com microrganismos é um dos fatores que interfere na qualidade das sementes, principalmente nos países tropicais, onde as condições climáticas diversificadas ampliam os problemas sanitários (Machado, 2000). Um dos aspectos de maior relevância para a qualidade das sementes é a sanidade, uma vez que estas constituem-se em importantes meios de transmissão de patógenos e como consequência dessa transmissão pode haver apodrecimento de sementes antes de germinarem, redução do vigor das plântulas, início de epidemias e, ou, introdução de patógenos em áreas isentas (Machado, 1987).

A planta da *Senna alata*, popularmente denominada de fedegoso gigante, manjerioba grande mata pasto ou candelabro, pertence à família Fabaceae Caesalpinoideae. É um arbusto de aproximadamente 3 metros de altura, nativo do Brasil, com flores amarelas, reunidas em espigas terminais. Contém frutos do tipo vagem, com numerosas sementes achatadas. Pode ser utilizada com finalidades ornamentais e terapêuticas (Lorenzi e Matos, 2008).

Solanum granulosoleprosum, denominada de fumo bravo, fumeiro ou gravitinga, pertence à família Solanaceae. É uma árvore, podendo atingir até 12 metros de altura, nativa, com flores brancas e roxas e fruto do tipo baga (Lopes, 2018; Flora digital RS, 2018). Estas plantas são utilizadas em programas de restauração, como espécies de recobrimento.

Para as espécies florestais brasileiras, dentre os primeiros trabalhos abordando a sanidade de sementes estão o conduzido por Carneiro (1986), que avaliou a microflora associada às sementes de dezoito gêneros, provenientes do Amazonas, Distrito Federal, Espírito Santo, Pará e Santa Catarina. Dentre os trinta gêneros de fungos detectados destacaram-se *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Phoma* e *Rhizoctonia*.

Mucci e Lasca (1986), ao verificarem os fungos associados às sementes de espécies de essências florestais, principalmente brasileiras, colhidas pelo Instituto Florestal de São

Paulo, relataram a presença dos gêneros *Alternaria*, *Diplodia*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Epicoccum* e *Cladosporium*.

A partir da década de 90 as pesquisas abordando a sanidade de sementes de espécies florestais se multiplicaram, pois muitos pesquisadores se conscientizaram da necessidade de obter informações adicionais sobre as espécies florestais, principalmente as brasileiras.

Santos et al. (2001), ao pesquisarem fungos associados às sementes das espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, identificaram os fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Botryodiplodia*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Stemphyllium*, além de *Aspergillus* e *Penicillium*, associados à deterioração de sementes armazenadas inadequadamente.

Em análises de sanidade conduzidas por Vechiato e Parisi (2013), com amostras de sementes de 12 espécies de sementes florestais, foram identificados 18 gêneros de fungos associados às sementes. Dos fungos detectados, os gêneros *Pestalotiopsis*, *Botrytis*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Macrophomina*, *Stemphyllium*, *Exserohilum*, *Curvularia* e *Fusarium* são considerados potencialmente patogênicos para as sementes florestais, podendo causar apodrecimento das sementes, manchas foliares, podridão de colo e raízes e doenças vasculares.

Carmo et al. (2017), pesquisaram a microflora de seis espécies florestais brasileiras e relataram a presença de fungos potencialmente patogênicos dos gêneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Phoma* e *Botrytis*.

Devido à demanda de sementes florestais para reflorestamento e outras finalidades, o intercâmbio de sementes entre regiões foi ampliado e poderá se constituir em um meio inevitável de movimentação de patógenos. Isto porque as sementes podem transportar superficialmente ou internamente muitos microrganismos. É um transporte para o qual não existem barreiras geográficas. Para muitos dos fitopatógenos conhecidos, as sementes significam um meio quase exclusivo de sobrevivência e assim podem ser transportados a longas distâncias. Dentre os microrganismos que podem associar-se às sementes, os fungos são o maior grupo, seguidos pelas bactérias e, em menor proporção, pelos vírus e nematoides (Machado, 2000).

A identificação dos microrganismos em associação com as sementes, por testes de sanidade, pode servir como subsídio para as decisões que visam atenuar a ação negativa dos

patógenos sobre a qualidade das sementes (Machado, 1988). Esta informação é de grande relevância para as sementes florestais, uma vez que as plantas de determinadas espécies apresentam periodicidade de produção de sementes, produzindo maior quantidade em um ano e menor no ano seguinte. É essencial, portanto, identificar os agentes e as consequências decorrentes da contaminação por microrganismos (Oliveira et al., 2012)

O objetivo do teste de sanidade é determinar o estado sanitário das sementes de uma amostra que, conseqüentemente, representará o lote. Essas informações possibilitam comparar a qualidade das sementes de diferentes lotes ou determinar a sua utilização comercial (BRASIL, 2009a).

Existem vários testes que podem ser empregados para caracterizar a sanidade das sementes. A escolha do método a ser utilizado depende do patógeno a ser detectado, da infraestrutura disponível no laboratório, da espécie de sementes a ser testada, do objetivo do teste, bem como do treinamento do pessoal envolvido na avaliação (Lucca Filho, 1987). Ainda, é importante que o método atenda a alguns requisitos como: reprodutibilidade, economicidade, rapidez na obtenção de resultados, além de eficiência, proporcionando a máxima recuperação de patógenos associados às sementes.

Os métodos comumente utilizados para a detecção de microrganismos em sementes incubadas, são o do papel de filtro ou “blotter test” e o método do plaqueamento em ágar, no qual o meio BDA (batata, dextrose, ágar) é o mais utilizado (Neergard, 1979). O teste em papel de filtro é apropriado para contaminações fúngicas com a presença de hifas, frutificações ou esporos, sendo eficaz para a detecção da maioria dos fungos transportados pelas sementes (Gasparotto, 2009). A identificação é baseada na morfologia fúngica desenvolvida durante o período de incubação (Agarwal e Sinclair, 1987). É uma das técnicas mais simples e baratas para a detecção de patógenos e outros microrganismos associados às sementes.

Algumas informações sobre hospedeiros, métodos de detecção e fungos já detectados em associação com sementes de espécies florestais brasileiras foram compiladas por Santos e Rego (2011) e Holbig et al. (2013), havendo variação das condições utilizadas, de acordo com a espécie estudada e com os pesquisadores, não havendo a padronização do substrato, da temperatura, da assepsia e do período de incubação.

Na comparação entre os substratos papel de filtro e BDA para detecção de fungos em sementes de espécies florestais brasileiras, o substrato papel de filtro foi eficiente na

recuperação dos fungos, como relatado nas pesquisas com sementes de: cedro (Benetti et al., 2009), guapuruvu (Cherobini et al., 2010), pata de vaca (Martinelli-Seneme et al., 2006), pau-brasil (Mendes et al., 2004), angico vermelho (Mesquita, et al., 2002), amendoim bravo (Nascimento et al., 2006), tapiá (Rego et al., 2004), baguaçu (Rego et al., 2008), caroba (Santos et al., 1998) e pau cigarra (Schultz et al., 2003) ou similar ao BDA, como descrito nas pesquisas com as sementes de paineira (Lazarotto et al., 2010), cedro (Lazarotto et al., 2012), pequi (Martins et al., 2007) e murta (Rego et al., 2012). A eficiência do BDA tem sido reportada em poucas situações, como nos estudos com sementes de faveleira (Nascimento et al. 2008), coquinho azedo (Magalhães et al., 2008) e paricá (Oliveira et al., 2012).

Para o método do papel de filtro, as análises das sementes florestais são efetuadas em períodos de 7 a 10 dias de incubação, associado às temperaturas que variam entre 18 e 26°C (Parisi e Santos, 2006).

O resultado de um teste de sanidade depende da reação do patógeno à condição de incubação. Fatores como o substrato, a temperatura e o tempo de incubação podem influenciar os resultados da análise sanitária, pois atuam diretamente no desenvolvimento dos microrganismos associados às sementes (Yorinori, 1987).

A utilização de condições propícias de detecção é a base para fornecer subsídios sobre os agentes potencialmente patogênicos associados às sementes, além de permitir a identificação e possibilitar o progresso nas pesquisas sobre as consequências desta associação.

A sanidade das sementes é, geralmente, avaliada por métodos estabelecidos para as espécies de ambiente temperado, havendo carência de estudos para as de ambiente tropical, especialmente para as sementes das espécies brasileiras. Assim, nessa pesquisa, foram avaliadas as sementes de *Senna alata* e *Solanum granulosoleprosum* em relação à temperatura e ao período de incubação adequados para a detecção de fungos associados às sementes destas espécies.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (22°42'30.8"S e 47°37'47.6"O), na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.

Para a pesquisa foram utilizadas sementes de fedegoso gigante (*Senna alata*) e fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*). Para cada espécie foram analisadas sementes de três lotes recém colhidos. Os lotes de *Senna alata* foram coletados na região de Penápolis- SP (21°24'47.8"S e 50°04'38.1"O) e os de *Solanum granulosoleprosum* na região de Piracicaba-SP (22°43'23"S e 47°38'59.3"O), em 2016.

Os testes de sanidade foram conduzidos pelo método do papel de filtro, conforme descrito no Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009b). As sementes, em número de 25 por placa para *S. granulosoleprosum* e 10 por placa para *S. alata*, foram dispostas equidistantemente em placas plásticas transparentes, de 9 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada. Em seguida, foram incubadas sob luz branca fluorescente e fotoperíodo de 12 horas, em diferentes temperaturas (20, 25 e 28°C) e períodos de incubação (5, 7 e 10 dias).

Após cada período de incubação, as sementes foram avaliadas individualmente, para observação das estruturas fúngicas presentes na superfície e identificação dos fungos por gênero, com auxílio de estereomicroscópio com resolução de 30-80 X e microscópio óptico.

Os resultados foram expressos em porcentagem de incidência de cada gênero detectado, considerado como potencialmente patogênico para a espécie analisada.

O delineamento experimental utilizado para cada espécie foi o inteiramente casualizado, com esquema fatorial de 3 (temperaturas) x 3 (períodos de incubação) e 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento, num total de 200 sementes. Para os cálculos das repetições foram consideradas 2 placas/repetição para *S.granulosoleprosum* e 4 placas/repetição para *Senna alata*. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa AgroEstat (Barbosa e Maldonado Jr ,2015).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de sanidade das sementes de *Solanum granulosoleprosum* indicaram que todas as temperaturas e períodos de incubação utilizados possibilitaram a detecção dos fungos *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, com variações nas porcentagens de incidência, de acordo com o gênero e o lote analisados.

Para *Fusarium* sp., as incidências detectadas variaram entre os lotes analisados, sendo os resultados mais elevados observados para o lote 1, seguido pelos lotes 3 e 2 (Tabela 1).

Houve interação entre as temperaturas e os períodos de incubação testados para as sementes dos lotes 1 e 2 e as temperaturas de 20 e 25°C possibilitaram as maiores porcentagens de incidência.

Tabela 1 - Incidência (%) de *Fusarium* sp. em sementes de *Solanum granulosoleprosum*, lotes 1, 2 e 3, submetidas a diferentes temperaturas e períodos de incubação (dias após a semeadura).

PERÍODO	TEMPERATURA (°C)									
	LOTE 1			LOTE 2			LOTE 3			
	20	25	28	20	25	28	20	25	28	Média
5 DAS	54,0 bA*	58,4aA	24,4 bB	3,6abA	1,6 bA	2,0 bA	6,0	11,0	3,6	6,9 b
7 DAS	62,4 bA	67,0aA	49,0aB	0,6 bB	2,5abAB	7,6aA	15,0	12,4	11,0	12,8ab
10 DAS	77,0aA	67,0aA	9,6 cB	8,0aA	7,0aA	1,6 bB	13,0	21,6	15,6	16,7a
Média							11,3A	15,0A	10,1A	
CV (%)		11,6			75,9			55,5		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os resultados obtidos para as sementes do lote 1 possibilitaram uma maior discriminação das condições favoráveis, provavelmente devido à maior incidência do fungo observada. As médias obtidas com as temperaturas de 20°C com incubação por 10 dias e 25°C, com incubação por 7 ou 10 dias e fotoperíodo de 12 horas (resultados de aproximadamente 70%), indicaram serem estas condições propícias à detecção de *Fusarium* sp. As mesmas condições também foram favoráveis à recuperação deste fungo nas

sementes do lote 2. Em relação aos resultados apresentados para as sementes do lote 3, apesar de não haver diferença significativa entre as médias obtidas para as temperaturas testadas, as diferenças estatísticas observadas entre as médias dos períodos de incubação demonstraram que 7 ou 10 dias seriam os períodos mais favoráveis à obtenção de maiores incidências.

As menores incidências de *Fusarium* sp. foram, de um modo geral, observadas à temperatura de 28 °C com incubação por 5 dias.

Para *Aspergillus* sp. (Tabela 2), assim como constatado para *Fusarium* sp. (Tabela 1), as porcentagens de incidência relatadas variaram entre as sementes analisadas, sendo os resultados superiores observados para as sementes do lote 1, seguido pelos lotes 3 e 2.

Houve interação entre as temperaturas e os períodos de incubação pesquisados somente para o resultado das sementes do lote 2. Neste caso, as maiores incidências foram identificadas sob temperatura de 28°C.

Tabela 2 - Incidência (%) de *Aspergillus* sp. em sementes de *Solanum granulosoleprosum*, lotes 1, 2 e 3, submetidas a diferentes temperaturas e períodos de incubação (dias após a semeadura).

PERÍODO	TEMPERATURA (°C)											
	LOTE 1				LOTE 2				LOTE 3			
	20	25	28	Média	20	25	28		20	25	28	Média
5 DAS	32,0*	38,4	43,0	37,8a	3,6aAB	1,6aB	7,6aA		12,0	17,0	12,0	13,7a
7 DAS	24,0	33,0	45,6	34,2a	3,0aB	4,5aB	11,0aA		11,0	16,4	18,4	15,3a
10 DAS	17,6	27,0	33,6	26,1 b	6,4aA	3,6aA	4,0aA		12,0	18,0	27,6	19,2a
Média	24,5B	32,8A	40,7A						11,7B	17,1AB	19,3A	
CV (%)	24,4				55,8				42,5			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúsculas entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As temperaturas influenciaram significativamente os resultados obtidos para as sementes analisadas dos três lotes; 28 e 25°C foram as mais propícias para a detecção, uma vez que resultaram em porcentagens de incidência mais elevadas, sobretudo para as sementes dos lotes 1 e 3. Para estes mesmos lotes, os resultados observados mediante a

utilização da temperatura de 28°C para incubação foram significativamente superiores aos obtidos quando foi utilizada a temperatura de 20°C.

O período de incubação só apresentou diferença significativa para as sementes do lote 1. Para estas sementes os períodos de 5 e 7 dias após a semeadura mostraram-se mais favoráveis quando comparados à incubação por 10 dias.

Um aspecto interessante a ser considerado é que a temperatura de incubação que possibilitou a recuperação de maiores porcentagens de incidência para *Aspergillus* sp. (28°C) foi também aquela na qual houve menor incidência de *Fusarium* sp., indicando que, uma das razões para uma maior incidência pode ter sido a redução da competição encontrada entre esses fungos, facilitando o desenvolvimento e a prevalência de *Aspergillus* nas sementes, quando mantidas a 28°C. Em função deste resultado, a temperatura de 28°C não é recomendada para a análise de sanidade de sementes de *S. granulosoleprosum* em rotina, uma vez que poderia subestimar a qualidade sanitária destas sementes.

Os resultados de incidência de *Penicillium* sp. (Tabela 3) variaram bastante entre as sementes dos lotes 1, 2 e 3 uma vez que, para os lotes 2 e 3 as porcentagens de incidência observadas foram muito baixas, próximas a zero.

Tabela 3 - Incidência (%) de *Penicillium* sp. em sementes de *Solanum granulosoleprosum*, lotes 1, 2 e 3, submetidas a diferentes temperaturas e períodos de incubação (dias após a semeadura).

PERÍODO	TEMPERATURA (°C)										
	LOTE 1			LOTE 2				LOTE 3			
	20	25	28	20	25	28	Média	20	25	28	Média
5 DAS	45,6aA*	41,0aA	4,4 bB	0,0	0,0	0,0	0,0a	1,6	0,6	0,0	0,7a
7 DAS	21,6 bA	29,6aA	18,0 bA	0,0	0,0	0,0	0,0a	0,6	2,4	0,0	1,0a
10 DAS	17,0 bB	12,4 bB	50,0aA	0,0	0,6	1,0	0,5a	0,0	0,0	1,6	0,5a
Média				0,0A	0,2A	0,3A		0,7A	1,0A	0,5A	
CV (%)	33,2			305,5				183,2			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Houve interação entre as temperaturas e os períodos de incubação pesquisados somente para as análises conduzidas com as sementes do lote 1. Neste caso, as

porcentagens de incidência superiores foram obtidas com a incubação sob temperatura de 28°C por 10 dias e 20°C por 5 dias, ou seja, condições bem variadas e extremas. Não foram observadas diferenças significativas entre as temperaturas ou entre os períodos de incubação pesquisados, para os lotes 2 e 3, dificultando qualquer observação sobre condições mais propícias neste caso em particular.

Dentre as sementes de *S. granulosoleprosum* analisadas, as pertencentes ao lote 2 apresentaram melhor qualidade sanitária, uma vez que os resultados de incidência de fungos observada para os três gêneros detectados foi inferior aos das sementes dos demais lotes.

As análises de sanidade das sementes de *Senna alata* indicaram que, a exemplo do que foi constatado para *S. granulosoleprosum*, todas as temperaturas e períodos de incubação utilizados possibilitaram a detecção dos fungos *Alternaria* e *Fusarium* com variações nas porcentagens de incidência, em função do gênero e do lote analisados.

Para *Alternaria* sp., as porcentagens de incidência detectadas foram similares entre as sementes analisadas, estando aproximadamente na faixa de 20 a 40% nas condições de temperatura mais adequadas, ou seja, temperaturas de 20 e 25°C (Tabela 4).

Tabela 4 - Incidência (%) de *Alternaria* sp. em sementes de *Senna alata*, lotes 1, 2 e 3, submetidas a diferentes temperaturas e períodos de incubação (dias após a semeadura).

PERÍODO	TEMPERATURA (°C)								
	LOTE 1			LOTE 2			LOTE 3		
	20	25	28	20	25	28	20	25	28 Média
5 DAS	27,0 bA*	14,5 bB	2,0aC	20,4aA	15,0 bA	3,6aB	22,0	13,6	4,4 13,3a
7 DAS	39,0aA	18,5 bB	6,4aC	23,0aA	19,6 bA	5,0aB	25,0	19,6	3,6 16,1a
10 DAS	15,6 cB	32,0aA	5,6aC	17,0aB	35,0aA	6,0aC	18,4	21,6	4,0 14,7a
Média							21,8A	18,3A	4,0B
CV (%)	28,6			37,4			35,2		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Houve interação significativa entre as temperaturas e os períodos de incubação testados para as sementes dos lotes 1 e 2. Nestes casos, a recuperação do fungo foi superior sob as condições de incubação de 20°C por 7 dias (39% e 23% respectivamente para as

sementes do lote 1 e 2) e 25°C por 10 dias (32 e 35% respectivamente para os lotes 1 e 2). Para o lote 3, apesar de não haver interação, as maiores médias de incidência foram observadas para as temperaturas de 20 e 25°C.

As menores incidências de *Alternaria* foram obtidas sob a temperatura de 28°C, independentemente do lote analisado ou do período de incubação utilizado. A temperatura de 20°C com incubação por 7 dias e a de 25°C, com incubação por 10 dias e fotoperíodo de 12 horas foram as mais propícias à detecção de *Alternaria* sp. nas sementes de *Senna alata*.

Para *Fusarium* sp., não houve grande diferença entre as porcentagens de incidência detectadas nas sementes dos três lotes analisados (Tabela 5). Houve interação entre as temperaturas e períodos de incubação testados somente para o lote 3, sendo o resultado mais elevado observado sob a condição de incubação de 28°C por 10 dias.

Tabela 5 - Incidência (%) de *Fusarium* sp. em sementes de *Senna alata*, lotes 1, 2 e 3, submetidas a diferentes temperaturas e períodos de incubação (dias após a semeadura).

PERÍODO	TEMPERATURA (°C)										
	LOTE 1				LOTE 2				LOTE 3		
	20	25	28	Média	20	25	28	Média	20	25	28
5 DAS	9,0*	10,0	7,0	8,7 b	12,4	12,4	10,0	11,6a	2,4aA	6,0aA	3,0 bA
7 DAS	11,6	12,4	16,0	13,3 b	7,0	8,4	17,0	10,8a	11,6aA	11,0aA	11,0 bA
10 DAS	15,6	30,4	21,6	22,5a	9,6	20,4	18,0	16,0a	8,0aB	11,0aB	29,6aA
Média	12,1A	17,6A	14,9A		9,7A	13,7A	15,0A				
CV (%)	40,7				44,5				54,7		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Como não houveram diferenças estatísticas significativas entre as médias de temperatura verificadas para as sementes dos lotes 1 e 2, a única informação sobre a influência da temperatura é a obtida para as sementes do lote 3, isto é, 28°C.

O fato da temperatura de 28 °C não ter favorecido o desenvolvimento de *Alternaria* sp. (Tabela 4), pode ser uma das razões para a obtenção de maior incidência de *Fusarium* sp., ou seja, por se tratar de fungos que estão frequentemente associados às sementes de diferentes espécies e se desenvolvem rapidamente no método do papel de filtro, a menor competição encontrada entre os gêneros, facilitou o desenvolvimento e a prevalência de

Fusarium sp. na superfície das sementes, a exemplo do que foi observado para *Aspergillus* e *Fusarium*, detectados em sementes de *S. granulosoleprosum*.

É importante considerar que, por não ter sido favorável ao desenvolvimento de *Alternaria*, a temperatura de 28°C não poderia ser recomendada para um teste cujo objetivo é a identificação de fungos potencialmente patogênicos associados ao lote, principalmente se o critério quantitativo for tão ou mais relevante que o qualitativo. Como, para a espécie em estudo, ainda não há informações que elucidem a interferência de fungos na qualidade e na produção de mudas, a utilização desta temperatura poderia subestimar a qualidade sanitária de um lote, como também o risco potencial associado à utilização destas sementes em escala comercial.

Em relação aos dias de incubação após a semeadura (DAS), houve diferenças significativas somente nas médias do lote 1, sendo 10 DAS o período mais favorável. De um modo geral, as temperaturas de 25 e 28°C com incubação por 10 dias e fotoperíodo de 12 horas foram propícias à detecção de *Fusarium* sp. associado às sementes de *S. alata*.

Os fungos dos gêneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, identificados nas sementes de *Solanum granulosoleprosum* e *Senna alata* têm sido frequentemente relatados em associação com diferentes espécies florestais (Santos et al., 2001; Vechiato e Parisi 2013; Carmo et al., 2017).

Alternaria sp. é considerado potencialmente patogênico para as sementes de espécies florestais, podendo causar podridão de sementes, manchas foliares e danos em plântulas (Holbig et al., 2013; Vechiato e Parisi, 2013).

Segundo Resende et al. (2008) *Fusarium* sp. está associado ao tombamento de plântulas em viveiro de mudas florestais, bem como às podridões das raízes e do colo.

Sales e Castro (1994) constataram que os fungos *Alternaria alternata* e *Fusarium* sp., reduziram a germinação de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e barbatimão (*Strphnodendron adstringens*). Maciel et al. (2013) verificaram que estes fungos podem estar associados às anormalidades das plântulas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata*).

Aspergillus e *Penicillium* são considerados fungos do armazém, pois podem colonizar as sementes após a colheita, causando podridões e deterioração durante o armazenamento, sobretudo quando as sementes são mantidas com alta umidade (Wetzel, 1987). Cherobini et al. (2008) verificaram que, para as sementes de cedro, a presença destes fungos pode causar perdas na germinação em consequência do apodrecimento. A presença destes fungos em

associação com as sementes de *S. granulosoleprosum* pode denotar que algumas das operações pós colheita, como secagem e armazenamento não se processaram de maneira apropriada.

É possível observar que as três condições de temperatura e dias de incubação pesquisados viabilizaram a detecção de fungos associados às sementes de *Solanum granulosoleprosum* e *Senna alata*, independentemente do gênero e da espécie analisados. Variações na porcentagem de incidência foram observadas, segundo o gênero detectado. As condições que se mostraram propícias na maior parte dos casos, ou seja, utilização de temperaturas de 20 ou 25°C durante 7 ou 10 dias, estão de acordo com o preconizado por Parisi e Santos (2006) para a análise sanitária das sementes de espécies florestais. Segundo estes autores, para o método do papel de filtro, as análises das sementes são efetuadas em períodos de 7 a 10 dias de incubação, associado às temperaturas que variam entre 18 e 26°C.

Em levantamento realizado por Santos e Rego (2011), relacionando métodos empregados para detectar fungos associados às sementes de espécies florestais, pertencentes a diferentes famílias, as condições utilizadas para incubação envolveram temperaturas de 20 ou 25°C durante cerca de 7 dias, para a maioria das espécies listadas.

Pesquisas envolvendo a comparação de temperaturas de incubação não têm sido frequentes no segmento das sementes florestais, porém Angelotti (2012), em estudos conduzidos visando a detecção de fungos em sementes de espécies nativas da Caatinga, verificou que a temperatura foi um fator importante, provocando diferenças na incidência de fungos fitopatogênicos. *Fusarium* sp. foi detectado em sementes incubadas sob temperaturas de 15 a 25 °C, enquanto que *Alternaria* sp. foi identificado sob condições de 15 a 30°C. Por outro lado, Wetzel (1987) citou que os fungos de armazenamento, como *Penicillium* e *Aspergillus*, em geral crescem rapidamente a 30-32°C, sendo que algumas espécies de *Penicillium* podem se desenvolver em temperaturas mais baixas.

Como demonstrado diante dos resultados apresentados (Tabelas 1 a 5), a tarefa de determinar uma temperatura associada ao período de incubação propícios ao desenvolvimento de todos os gêneros de fungos detectados é complexa, principalmente considerando que algumas situações são contraditórias. O método do papel de filtro padrão, utilizado para a maioria das espécies cultivadas (Brasil, 2009b), com incubação a 20°C por 7

dias e fotoperíodo de 12 horas, proposto por Neergaard (1979), só foi adequado para a detecção de *Alternaria alternata* em sementes de *S. alata* (Tabela 4), que também podem ser incubadas a 25°C sem diferença significativa nas porcentagens de incidência obtidas.

As condições mais propícias à detecção de fungos associados às sementes de *S. granulosoleprosum* foram 25°C por 7 ou 10 dias e para as sementes de *S. alata*, a condição ideal foi a utilização de 25°C por 10 dias. Estas informações confirmam que nem sempre as condições padronizadas com base na análise de espécies de clima temperado (Neergard, 1979) são as mais adequadas para a detecção de fungos associados às sementes de espécies tropicas, como são as espécies analisadas nesta pesquisa.

Embora algumas variáveis tenham sido avaliadas nesta pesquisa, outros fatores, além da temperatura e período de incubação, também podem interferir na identificação da microflora associada às sementes nos testes de sanidade como, por exemplo, a representatividade da amostra analisada, a calibração dos equipamentos utilizados, o treinamento dos analistas e, mesmo a quantidade de água do substrato. Este último fator, aliado à temperatura e ao período de incubação é um elemento essencial ao desenvolvimento dos fungos, podendo interferir consistentemente no resultado da incidência, porém ainda não foi objeto de padronização por parte dos pesquisadores, como ocorre no caso da recomendação da proporção de água, adotada nos testes de germinação (Brasil, 2009a).

O presente trabalho é o primeiro relato de fungos associados às sementes de fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*) e fedegoso gigante (*Senna alata*) e mostra que sementes destas espécies podem atuar como veículo de disseminação de fungos potencialmente fitopatogênicos, tais como: *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp.. A utilização crescente destas espécies com diferentes objetivos, justifica a necessidade de estudos visando elucidar a importância desses fungos na qualidade de sementes e mudas.

2.4 CONCLUSÕES

Há a detecção de fungos potencialmente patogênicos associados às sementes de *Solanum granulosoleprosum* por meio do método do papel de filtro, com incubação a 25°C por 7 ou 10 dias.

Há a detecção de fungos potencialmente patogênicos associados às sementes de *Senna alata* por meio do método do papel de filtro, com incubação a 25°C por 10 dias.

Os fungos de campo, potencialmente patogênicos, identificados nas sementes de *Senna alata* foram *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. e nas sementes de *S. granulosoleprosum* *Fusarium* sp.. Os fungos de armazenamento *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp, foram identificados somente nas sementes de *S. granulosoleprosum*.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. v.2. Boca Raton: CRC Press, 1987.

ANGELOTTI, F. Impacto da temperatura em patologia de sementes nativas da Caatinga. **Informativo Abrates**, v.22, n. 3, p.41-44, 2012.

BARBOSA J.C.; MALDONADO JR W. Experimentação agrônômica & Agroestat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Jaboticabal: Multipress, 2015. 396p.

BENETTI, S. C.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; JACCOUD FILHO, D. S. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira** , v. 29, n. 58, p. 81-85, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009a. 395p.

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

CARMO, A. L. M.; MAZARATTO, E. J.; ECKSTEIN, B.; SANTOS, A. F. Associação de Fungos com Sementes de Espécies Florestais Nativas. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.3, p.246-247, 2017.

CARNEIRO, J.S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.557-566, 1986.

CHEROBINI, E. A. I.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2008.

CHEROBINI, E. A. I.; LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; GIRARDI, L. B.; LIPPERT, D. B.; MACIEL, C. G. Qualidade de sementes e mudas de *Schizolobium parahyba* procedentes do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. **Cerne**, v. 16, n. 3, p. 407-413, 2010.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php&especie=3850>. Acesso em 22 ago 2018.

GASPAROTTO, F.; VIDA, J.B.; TESSMANN, D.J.; BONALDO, S.M.; AGUIAR, R.L.; PENHARBEL, M.P. Eficiência de métodos para detecção de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 397-402, 2009.

HOLBIG, L.S.; AVELAR, S.A.G; GADOTTI, G.I.; SALINAS, J.C.T.; ZANATTA, G.C.N. Fungos associados a sementes de espécies florestais. In: SCHUCH, L.O.B; VIEIRA, J.F.; RUFINO, C.A.; ABREU JÚNIOR, J.S. **Sementes: produção, qualidade e inovações tecnológicas**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2013. cap.4, p. 87-118.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; 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**, v. 22, n. 3, p. 493-503, 2012.

LOPES, G.L. Compêndio Digital. Disponível em: <<https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/9452-2/>>. Acesso em 22 ago 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p

LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap.10, p.276-298.

MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.1, p.3-15.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC-ESAL-FAEPE,1988, 106p.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: PS/UFLA/FAEPE, 2000, 137p.

MACIEL, C.G.; SOUZA, L.B.; BOVOLINI, M. P.; BRUM, D. L.; MUNIZ, M. F. B.; BURIOL, G. A.; Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata*). **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 75, p. 331-338, 2013.

MAGALHÃES, H. N.; CATÃO, H. C. R. M.; SALES, N. L. P.; LIMA, N. F.; LOPES, P. S. N. Qualidade sanitária de sementes de coquinho azedo (*Butia capitata*) no Norte de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2371-2374, 2008.

MARTINELLI-SENE, A.; POSSAMAI, E.; SCHUTA, L.R.; VANZOLINI, S. Germinação e sanidade de sementes de *Bauhinia variegata*. **Revista Árvore**, v.30, n.5, p.719-724, 2006.

MARTINS, C. P. S.; CATÃO, H. C. R. M.; SALES, N. L. P.; MOREIRA, T. M. B.; LOPES, P.S. N. Qualidade sanitária de sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) procedentes do Norte de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, supl., p.200, 2007. Edição dos resumos do 40º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá.

MENDES, S. S.; SANTOS, D. M.; MOURA, A. O.; FRANCO FILHO, E.; MESQUITA, J. B. Qualidade sanitária de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, João Pessoa,2004. **Palestras e Resumos ...**, João Pessoa, 2004, p.193.

MESQUITA, J. B.; MATEUS, B. N.; SANTANA, G. C. Levantamento da microbiota associada a sementes de angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* Benth), copaíba (*Copaifera langsdorfii* Benth) e jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra* Fr.All). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7, 2002, Sete Lagoas. **Resumos e Palestras**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002, p. 65.

MUCCI, E.S.M.; LASCA, C.C. Flora fúngica de sementes de essências florestais nativas. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n.2, p. 352-353, 1986.

NASCIMENTO, L.C.; MATA, M.F.; SILVA, K.B.; ARAUJO, E.; COUTINHO, O.L. Efeito do extrato de nim sobre a microflora da semente de faveleira (*Cnidoscylus phylacanthus*). *Tropical Plant Pathology*, v.33, supl., p.276, 2008. Edição dos Resumos do 41º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2008, Belo Horizonte.

NASCIMENTO, W. M. O.; CRUZ, E. D.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae-Caesalpinioidea). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p.149-153, 2006.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: Mac Millan Press, 1979, v.1, 839 p.

OLIVEIRA, J. D.; SILVA, J. B.; DAPONT, E. C.; SOUZA, L. M. S.; RIBEIRO, S. A. L. Métodos para detecção de fungos e assepsia de sementes de *Schizolobium amazonicum* (Caesalpinioideae). **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 945-953, 2012.

PARISI, J.J.D.; SANTOS, A.F. Descrição de doenças, detecção e controle de patógenos transmitidos por sementes de essências florestais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 9, 2006, Passo Fundo. (Resumos). Passo Fundo: UFP, 2006, 1 CD-ROM.

REGO, S. S.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; ABREU, D. C. A. Fungos associados às sementes de tapiá (*Alchornea triplinervia* Sprengel) – Euphorbiaceae. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 3, 2004, Colombo. **Anais...Colombo: EMBRAPA FLORESTAS**, 2004. 1 CD-ROM. Resumo. (Embrapa Florestas. Documentos, 102).

REGO, S. S.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; JACCOUD FILHO, D. S. Fungos associados às sementes de baguaçu. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 379, 2008.

REGO, S. S.; SANTOS, A. F.; NOGUEIRA, A. C.; KUNIYOSHI, Y. S. Detection, transmission and pathogenicity of fungi on *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. Seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n.1, p. 009-013, 2012.

RESENDE, M.L.V.; PÁDUA, M.A.; TOYOTA, M. Manejo das Doenças Associadas a Viveiros Florestais. In: DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A. (Ed.). **Produção de Sementes e Muda de Espécies Florestais**. Lavras: UFLA, 2008. cap.4, p.141-151.

SALES, N.L.P.; CASTRO, H.A. Efeito da população fúngica sobre a germinação das sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols) e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Ciência e Prática**, v.18, n.1, p.83-89, 1994.

SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S.; SANTANA, D.L.Q. Fungos associados às sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.42, p.51-60, 2001.

SANTOS, A.F.; REGO, S.S. Hospedeiros, métodos de detecção e fungos encontrados em sementes florestais. In: SANTOS, A.F.; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. (Ed. Técnicos). **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. cap.9. p. 115-187.

SANTOS, M. F.; RIBEIRO, F.W.; FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N. Avaliação da qualidade sanitária e fisiológica das sementes de caroba (*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.1, p. 1-6, 1998.

SCHULTZ, V.S; SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S. Qualidade sanitária de sementes de pau-cigarra (*Senna multijuga*). **Boletim de Pesquisas Florestais**, n.47, p.123-128, 2003.

VECHIATO, M.H.; PARISI, J.J.D. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. **Biológico**, v.75, n.1, p.27-32, 2013.

WETZEL, M.M.V.S. Fungos do armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S.(Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.9, p.260-275.

YORINORI, J.T. Fatores que afetam os resultados dos testes de sanidade envolvendo incubação. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S.(Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.11, p.299-312.

3 MÉTODO PARA A GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Solanum granulosoleprosum*

Resumo

Uma das limitações para a utilização das sementes de fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*) é causada pela verificação da germinação dessas sementes, pois não há, ainda, um método descrito para avaliação deste parâmetro. Nesta pesquisa foram avaliados a temperatura, a luz, a posição das sementes no substrato papel e a utilização de KNO_3 . Inicialmente, em câmaras de incubação (BOD), foram avaliadas temperaturas, constante e alternada (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 15-35°C, 20-30°C), sem luz e com 8h de fotoperíodo diário. Na sequência, utilizando as temperaturas 15-35°C e 20-30°C, foram testados os substratos entre papel e sobre papel, sem luz e com 8h de fotoperíodo diário. Em um último ensaio, foi verificada a interferência do umedecimento do substrato com KNO_3 , utilizando as temperaturas e posição das sementes nos substratos, porém com 8h de fotoperíodo diário. Os resultados indicam que: a alternância de temperatura 20-30°C, utilizando a semeadura entre papel ou sobre papel, assim como a alternância a 15-35°C utilizando a semeadura sobre papel, associados ao fotoperíodo de 8 horas e à utilização de solução de KNO_3 a 0,2% para umedecimento do substrato são condições propícias para o teste de germinação das sementes de *S. granulosoleprosum*; nestas condições, a primeira avaliação deve ser realizada aos 10 dias e a final aos 35 dias após a semeadura.

Palavras-chave: Alternância de temperatura; Fumo bravo; Nitrato de potássio

Abstract

One of the limitations for the use of wild smoke seeds (*Solanum granulosoleprosum*) is caused by the germination of these seeds, since there is no method described for the evaluation of this parameter. In this research the temperature, light, position of the seeds in the paper substrate and the use of KNO_3 were evaluated. Initially, constant and alternated temperatures (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C and 15-35°C, 20-30°C) were checked using incubation chambers (BOD) without light and with 8h of daily photoperiod. Subsequently, the position of the seeds between paper and on top of paper were tested, using temperatures of 15-35 ° C and 20-30 ° C, without light and with 8h of daily photoperiod. In a final assay, the interference of the substrate wetting with KNO_3 was verified, using the temperatures and position of the seeds on the substrate, but with 8h of daily photoperiod. The results indicate that: the temperature alternation 20-30°C, using sowing between paper or on top of paper, as well as the alternation at 15-35 ° C using sowing on top of paper, associated to the 8-hour photoperiod and the use of solution of 0.2% KNO_3 for substrate wetting are suitable conditions for the germination test of *S. granulosoleprosum* seeds; under these conditions, the first evaluation should be carried out at 10 days and at the final at 35 days after sowing.

Keywords: Alternated temperature; Wild smoke; Potassium nitrate

3.1 INTRODUÇÃO

O interesse na multiplicação de espécies florestais brasileiras tem se intensificado, devido à ênfase atual nos problemas ambientais, ressaltando a necessidade de programas de recuperação de áreas degradadas e recomposição de paisagens. Entretanto, apesar das sementes constituírem o insumo básico para a sustentação destas iniciativas, não há conhecimento disponível para o manejo e análise de sementes da maioria dessas espécies, de modo que possam caracterizar seus atributos físico, fisiológico e sanitário. É preciso obter informações básicas sobre a germinação, o cultivo e a aplicabilidade dessas espécies nativas, visando sua utilização para fins diversos (Araujo Neto et al. 2003; Sarmiento e Villela, 2010).

Solanum granulosoleprosum, conhecida como fumo bravo, fumeiro ou gravitinga, pertence à família Solanaceae. Ocorre na Argentina, Paraguai, Uruguai e nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Castellani et al., 2007). Espécie pioneira, tem sido utilizada regularmente em programas de restauração de áreas degradadas, com a finalidade de recobrimento (Petenatti et al., 1998; Valio e Scarpa, 2001) e também apresenta propriedades terapêuticas, como anti-inflamatório, calmante e cicatrizante (Petenatti et al., 1998). É uma árvore, podendo atingir até 12 metros de altura, com flores brancas e roxas e fruto do tipo baga (Lopes, 2018; Flora Digital RS, 2018). As sementes são elipsoides, com superfície do tegumento levemente brilhante, de coloração amarela (Castellani et al., 2008).

Segundo Guedes et al. (2009), as sementes constituem a via de propagação mais empregada na implantação de florestas, devido ao fato de ser um meio rápido e geralmente não dispendioso, sendo de fundamental interesse o estudo de vários fatores que interferem na propagação, principalmente a germinação e vigor, que influenciam de forma direta na dispersão das espécies.

Embora as metas nacionais de restauração de ecossistemas tenham gerado uma ampla expectativa para o setor de sementes dos diferentes biomas do país, não há sintonia entre programas governamentais e os diferentes profissionais e processos envolvidos nessa cadeia produtiva. A falta de tecnologias apropriadas para a produção e a análise de sementes estão entre os gargalos apresentados pelo setor (Freire et al., 2017)

Apesar das orientações contidas nas Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (Brasil, 2013) são essenciais pesquisas que forneçam informações sobre a qualidade das sementes, especialmente no que diz respeito à padronização, à agilização, ao

aperfeiçoamento e ao estabelecimento dos métodos de análise, visto que, para um número significativo de espécies não há ainda método descrito, como é o caso das sementes de *Solanum granulosoleprosum*.

A germinação das sementes ortodoxas é um processo que envolve o reinício e a continuidade das atividades metabólicas, promovendo o desenvolvimento das estruturas do embrião, com a formação de uma plântula. É necessário que alguns fatores relacionados à semente e ao ambiente atuem de forma favorável. Para tanto, é essencial que a semente esteja viva, sem dormência e que haja disponibilidade de água, temperatura e oxigênio. (Popinigis, 1985; Novembre et al., 2007).

A avaliação da germinação das sementes é efetuada pelo teste de germinação, conduzido em laboratório em condições controladas e por meio de métodos padronizados que visam, principalmente, determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes (BRASIL, 2009).

Tanto para os fisiologistas vegetais como para os tecnologistas de sementes a germinação tem início a partir da embebição, porém para os fisiologistas o processo é finalizado com a protrusão da raiz primária, enquanto que, para os tecnologistas, o encerramento ocorre somente após o desenvolvimento da estrutura embrionária e a formação de uma plântula, indicando a habilidade de produzir uma plântula normal sob condições favoráveis, permitindo, assim, o uso correto das sementes e a solução de possíveis problemas detectados a partir do teste de germinação (Copeland e McDonald, 2001; Black et al., 2008).

Normalmente, para a condução do teste de germinação de diferentes espécies, é recomendado o uso de determinada temperatura e tipo de substrato ideal, além da presença de luz ou algum outro tratamento requerido para promover a germinação (Popinigis, 1985; Brasil, 2009);

A escolha do substrato deve considerar a facilidade e eficiência do uso, além de aspectos morfológicos das sementes (principalmente tamanho e forma), as exigências em relação à água e à luz e, também, a facilidade que o substrato oferece para as avaliações das plântulas (Figliola et al., 1993; Ferraz e Calvi, 2010). Durante o teste de germinação o suprimento de água é realizado através do substrato, que é o componente responsável por manter a proporção adequada entre a disponibilidade de água e a aeração (Popinigis, 1985).

O papel está entre os tipos de substratos mais utilizados. Os tipos de papel estão descritos nas Regras para Análise de Sementes (RAS) e há variações nas modalidades de uso, como: sobre papel (SP) – indicado para sementes pequenas ou médias e exigentes em luz; entre papel (EP) – indicado para sementes pequenas ou médias, pouco exigentes em luz, porém que requerem mais umidade (Figliola et al., 1993; Ferraz e Calvi, 2010).

A temperatura, além da água, é um dos fatores que exerce influência significativa na germinação, agindo na velocidade de absorção de água e nas reações químicas que determinam o processo, interferindo, conseqüentemente, na porcentagem de plântulas normais, na velocidade e na uniformidade de germinação (Carvalho e Nakagawa, 2012). A germinação ocorre em determinados limites de temperatura dentro dos quais existe uma temperatura ou faixa considerada ótima. Nesta faixa o processo germinativo ocorre com maior eficiência, ou seja, equivale à temperatura na qual a semente expressa seu potencial máximo de germinação no menor espaço de tempo (Popinigis, 1985; Carvalho e Nakagawa, 2012).

A temperatura ótima de germinação não é a mesma para as sementes de todas as espécies, geralmente está relacionada com o ambiente do habitat natural, podendo haver relação direta entre essa temperatura e o bioma onde as sementes foram produzidas, ou seja, espécies tropicais requerem, geralmente, uma temperatura mais elevada do que espécies de zonas temperadas. Outros fatores, como o grupo sucessional, podem ter participação na definição da temperatura que estimula o processo germinativo (Brancalion et al., 2010). Estes mesmos autores recomendaram, para a condução dos testes de germinação de espécies brasileiras, o uso da temperatura constante de 25°C para as espécies dos biomas Cerrado e Mata Atlântica e de 30°C para as espécies do bioma Amazônia.

É importante considerar que, no ambiente natural as flutuações de temperatura, relativas aos períodos diurno e noturno, podem ser significativas; assim, algumas espécies requerem temperaturas alternadas (termoperíodo) para a germinação das sementes (Ferraz e Calvi, 2010).

A luz é outro fator, que pode ser benéfico à germinação de sementes de algumas espécies, as quais são classificadas fotoblásticas positivas, outras são fotoblásticas negativas, prejudicadas pela presença de luz, existindo ainda as indiferentes, que não apresentam sensibilidade à luz (Vidaver, 1977). A exigência de luz para germinar, por parte de

determinadas espécies, está relacionada a um tipo de dormência. A espécie, variedade, fatores ambientais antes e durante a germinação, além da resposta ao fotoperíodo são componentes que influenciam a sensibilidade à luz (Copeland e McDonald, 2001).

O nitrato de potássio (KNO_3) é um dos produtos químicos mais utilizados para promover a germinação em laboratório. Algumas sementes que apresentam resposta favorável à luz, também apresentam ao KNO_3 . Esta substância pode interagir com a temperatura, influenciando a germinação de algumas espécies (Copeland e McDonald, 2001).

O mecanismo de ação de substâncias receptoras de elétrons, como os nitratos, ainda necessita ser elucidado, porém, ao que tudo indica, a ação seria como um mecanismo de adaptação ecológica, indicando à semente a profundidade em que ela está no solo, semelhante ao que ocorre para a luz e temperaturas alternadas. Ou seja, na medida em que há proximidade da superfície do solo, há o aumento da disponibilidade de luz, nitratos e temperaturas alternadas (Carvalho e Nakagawa, 2012). Os nitratos são componentes químicos naturais dos solos, isto é, onde ocorre a germinação das sementes e podem ter importância ecológica através da geração de óxidos de nitrogênio (Bethke et al., 2007; Black et al., 2008).

Métodos de análise em laboratório, efetuados em condições controladas, de alguns ou de todos os fatores externos, têm sido estudados e desenvolvidos de maneira a permitir uma germinação mais uniforme, rápida e completa das sementes de uma amostra de determinada espécie. Estas condições, consideradas ótimas, são padronizadas para que os resultados dos testes de germinação possam ser reproduzidos e comparados, dentro de limites tolerados pelas RAS (Brasil, 2009).

O presente estudo teve a finalidade de avaliar a interferência da luz, da temperatura, da posição das sementes no substrato e do nitrato de potássio na germinação de sementes de *Solanum granulosoleprosum* visando estabelecer o método para avaliar a germinação das sementes desta espécie.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes, do Departamento de Produção Vegetal (22°42'11.6"S e 47°37'57.2"O), na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.

3.2.1 Sementes Utilizadas

Para o ensaio de temperatura e luz foram utilizadas sementes de fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*), três lotes, colhidas em 2016 e em 2017, enquanto que, para as pesquisas de substratos e nitrato de potássio (KNO₃) foram utilizadas sementes de três lotes colhidos em 2017.

Previamente à instalação dos ensaios de germinação, foi determinado o teor de água das sementes pelo método da estufa a 105±3°C por 24 horas (Brasil, 2009). Foram utilizadas duas repetições de 1,0 g de sementes (peso úmido) para todas as amostras testadas. Os resultados foram expressos em porcentagem, com base na média aritmética das repetições.

3.2.2 Avaliação da Temperatura e da Luz

Para a avaliação da influência da luz e da temperatura na germinação foram testadas, inicialmente, em câmaras de incubação (BOD), temperaturas, constantes e alternadas (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 15-35°C, 20-30°C), com ausência de luz e com fotoperíodo diário de 8 horas. A semeadura foi realizada sobre dois discos de papel mata-borrão, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,3 vezes a massa do papel seco, em placas plásticas transparentes (diâmetro de 9 cm). Para cada temperatura, foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes. As placas incubadas sob o regime de ausência de luz foram envoltas em papel alumínio e avaliadas em sala escura, sob luz verde.

As avaliações foram realizadas diariamente, por 40 dias, de acordo com critérios indicados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) e calculados a porcentagem e o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme proposto por Maguire (1962).

Ao final do teste, uma amostra das sementes de cada lote (cerca de 40), hidratadas, que permaneceram intactas no substrato foi submetida ao teste de tetrazólio para verificar

a viabilidade. Cada semente foi cortada longitudinalmente, dividida bilateralmente pela espessura, porém sem separar as duas metades. Em seguida, foram imersas em cerca de 10 ml de solução de tetrazólio 0,075% e incubadas em estufa a 40 °C, por 2 horas, adaptando-se a metodologia adotada por Santos et al. (2007).

3.2.3 Avaliação da Posição das Sementes no Substrato

Para a avaliação da posição das sementes no substrato foram testadas as sementeiras entre papel (EP) e sobre papel (SP), utilizando as temperaturas 15-35°C e 20-30°C, com ausência de luz e com fotoperíodo diário de 8 horas.

Para a posição SP, a sementeira foi realizada sobre duas folhas de papel mata-borrão, umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,3 vezes a massa do papel seco, mantidas em caixas plásticas (11 x 11 x 3 cm) transparentes (fotoperíodo) e pretas (ausência de luz). Para a posição EP, a sementeira foi realizada entre duas folhas de papel toalha, umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,2 vezes a massa do papel seco, posteriormente dobradas ao meio, no formato envelope ou “mini rolos”. Os envelopes incubados sob o regime de ausência de luz foram colocados em sacos plásticos pretos.

Para cada tratamento testado, foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes. Os testes incubados sob o regime de ausência de luz foram avaliados em sala escura, sob luz verde. As avaliações foram realizadas diariamente, por 40 dias, de acordo com critérios indicados nas RAS (Brasil, 2009) e calculados a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação (Maguire, 1962) e o tempo médio de germinação (Laboriau, 1983).

Ao final do teste, uma amostra das sementes de cada lote (cerca de 20), hidratadas, que permaneceram intactas no substrato foram submetidas ao teste de tetrazólio para verificar a viabilidade, seguindo metodologia descrita em 3.2.2.

3.2.4 Avaliação da Utilização do Nitrato de Potássio (KNO₃)

Para a avaliação da interferência do KNO₃ na germinação de sementes de *Solanum granulosoleprosum*, foi utilizado o umedecimento dos substratos (EP) e (SP), com solução de KNO₃ a 0,2% e com água, utilizando as temperaturas 15-35°C e 20-30°C, com fotoperíodo diário

de 8 horas. O umedecimento foi realizado na proporção de 2,3 vezes a massa do papel seco para as sementes colocadas na Sobre Papel (SP) e 2,2 vezes para as colocadas Entre Papel (EP), independentemente da solução utilizada. A semeadura foi realizada de acordo com o detalhado anteriormente em 3.2.3.

As avaliações foram efetuadas diariamente, por 40 dias, de acordo com critérios indicados nas RAS (Brasil, 2009) e calculados a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação (Maguire, 1962) e o tempo médio de germinação (Laboriau, 1983).

O delineamento experimental utilizado para cada ensaio foi o inteiramente casualizado. Para a avaliação de temperatura e luz, foi adotado o esquema fatorial de 7 (temperaturas) x 2 (regimes de luz) e 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento, num total de 100 sementes por tratamento.

Para a avaliação da posição das sementes no substrato, foi adotado o esquema fatorial somente para o teste de germinação, realizado, para cada temperatura, com 2 (substratos) x 2 (regimes de luz) e 4 repetições de 50 sementes, perfazendo um total de 200 sementes para cada tratamento. As demais variáveis (IVG e TMG) foram analisadas sem esquema fatorial, respeitando-se o delineamento adotado inicialmente.

Para a avaliação da utilização de Nitrato de Potássio (KNO_3), o esquema fatorial foi de 2 (soluções) x 4 (substratos+temperatura) e 4 repetições de 50 sementes, num total de 200 sementes para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa AgroEstat (Barbosa e Maldonado Jr, 2015).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de água das sementes de *S. granulosoleprosum* analisadas variaram entre 7,1% e 7,4%. Como a variação entre os resultados é mínima e todas as amostras foram submetidas à mesma condição de armazenamento durante a condução dos testes, há possibilidade de afirmar que as diferenças encontradas entre os resultados dos ensaios para as diferentes amostras analisadas não são causadas por possíveis variações nos respectivos teores de água iniciais.

3.3.1 Avaliação da Temperatura e da Luz

A avaliação do ensaio de temperaturas e luz (Tabela 1) indicou, para as sementes dos três lotes testados, que as temperaturas constantes entre 15°C e 35°C não são adequadas para a germinação das sementes de *Solanum granulosoleprosum*. A luz, associada às temperaturas alternadas 20-30°C e 15-35°C, favorece a germinação, inclusive é o que pode ser observado na Tabela 2 em relação ao IVG.

Tabela 1 – Germinação (%) de sementes de *S. granulosoleprosum*, lotes A, B e C, em função das variações da temperatura (15 a 35°C) e luz (luz e escuro).

TEMPERATURA (°C)	LOTE A			LOTE B		LOTE C		
	LUZ	ESCURO	Média	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO	Média
15	0	0	0* c	10 bcA	5 bcA	6	4	5 c
20	0	0	0 c	0 cA	0 cA	0	0	0 c
25	0	0	0 c	0 cA	0 cA	0	0	0 c
30	5	0	3 c	0 cA	0 cA	0	0	0 c
35	12	0	6 c	2 cA	3 bcA	8	0	4 c
20-30	15	15	15 b	18 bA	12 bA	13	13	13 b
15-35	29	29	29a	41aA	27aB	40	32	36a
Média	9A	6A				10A	7B	
CV (%)		71,6			55,8		51,9	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas contíguas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Resultados similares, nesse sentido foram relatados por Souza e Válio (2001) e Válio e Scarpa (2001), que, ao analisarem a germinação de sementes de *S. granulosoleprosum* a 25°C, utilizando o critério de emissão de raiz, obtiveram resultados nulos ou muito baixos, independentemente da presença ou não da luz. Em contrapartida, Fowler e Carpanezzi (1997) afirmaram que 25 e 30°C são as temperaturas adequadas para a germinação desta espécie.

Castellani et al. (2009), ao compararem a temperatura de 25°C com a alternada 20-30°C, para germinação de sementes de um único lote de *S. granulosoleprosum* verificaram resultados superiores para a temperatura alternada 20-30°C. Piña-Rodrigues e Martins (2012) prescreveram a alternância de temperatura como uma das técnicas utilizadas para

superação da dormência fisiológica em sementes de espécies da família Solanaceae, como é o caso de *Solanum granulosoleprosum* (Souza Junior e Brancalion, 2016).

Segundo Brancalion et al. (2010), a temperatura ideal para o teste de germinação das sementes das espécies arbóreas brasileiras da Mata Atlântica é 25 °C constante, porém as sementes das espécies pioneiras podem requerer variações de temperatura para a superação da dormência. Sementes de determinadas espécies germinam mais quando há a alternância da temperatura, pois esta condição corresponde às flutuações naturais encontradas no ambiente de clareira (Copeland e McDonald, 2001). Tal informação foi constatada no presente estudo, para as sementes de *S. granulosoleprosum*, uma espécie pioneira, que, com base nos resultados obtidos, requer temperaturas alternadas para germinar.

Embora tenham sido encontradas na literatura informações sobre pesquisas realizadas anteriormente com sementes de *S. granulosoleprosum*, utilizando diferentes temperaturas houve dificuldade em definir uma única temperatura para esta pesquisa. Em alguns casos foram utilizadas somente temperaturas constantes, noutros foram priorizadas as alternadas, porém com critérios de avaliação diferentes, e em todos os casos somente um lote foi analisado. Assim, a prioridade foi aferir as temperaturas recomendadas para o teste de germinação da maioria das espécies, utilizando sementes de três lotes diferentes de *S. granulosoleprosum*, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Em relação à influência da luz, a germinação das sementes de *Solanum granulosoleprosum* foi observada tanto em ausência como em presença de luz. Para as sementes dos lotes A e C, quando expostas às temperaturas alternadas de 15-35°C ou 20-30°C, os resultados de germinação obtidos no escuro e na presença de luz foram similares.

A interação entre a luz e a temperatura só foi constatada para os resultados de germinação das sementes do lote B. Neste caso, o maior resultado foi obtido sob exposição a 15-35°C, aliada à presença de luz.

É importante ressaltar que, apesar de terem sido observados resultados de germinação em condições de escuro, as médias de germinação com luz foram, para os lotes B e C, significativamente superiores às aquelas observadas quando a incubação foi em escuro. Esta informação é importante pois denota que a luz, apesar de não representar um componente essencial à germinação de sementes de *S. granulosoleprosum*, tem influência positiva neste processo. Observações similares foram apontadas por outros pesquisadores

(Válio e Scarpa, 2001) ao analisarem a emissão da radícula de sementes de fumo bravo sob temperaturas alternadas e ausência ou presença de luz.

Os resultados obtidos para o Índice de Velocidade de Germinação (IVG), apresentados na Tabela 2 corroboram os observados para a porcentagem de germinação.

Tabela 2 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *S. granulosoleprosum*, lotes A, B e C, em função das variações da temperatura (15 a 35°C) e luz (luz e escuro).

TEMPERATURA (°C)	LOTE A			LOTE B		LOTE C		
	LUZ	ESCURO	Média	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO	Média
15	0,00	0,00	0,00* c	0,08 cA	0,04 cA	0,05	0,06	0,05 c
20	0,00	0,00	0,00 c	0,00 cA	0,00 cA	0,00	0,00	0,00 c
25	0,00	0,00	0,00 c	0,00 cA	0,00 cA	0,00	0,00	0,00 c
30	0,05	0,00	0,02 c	0,00 cA	0,00 cA	0,00	0,00	0,00 c
35	0,09	0,00	0,05 c	0,02 cA	0,02 cA	0,06	0,00	0,03 c
20-30	0,23	0,16	0,19 b	0,21 bA	0,17 bA	0,16	0,18	0,17 b
15-35	0,35	0,26	0,30a	0,48aA	0,29aB	0,40	0,34	0,37a
Média	0,10A	0,06B				0,09A	0,08A	
CV (%)		78,6			57,0		58,9	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas contíguas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os dados de IVG superiores demonstram que, para as sementes dos três lotes analisados, as condições de temperatura mais adequadas para a germinação foram as alternadas, especialmente 15-35°C, seguida por 20-30°C.

De maneira mais clara à observada para a germinação, as médias de IVG obtidas para as sementes do lote A, assim como as do lote B à 15-35°C, quando expostas à luz foram significativamente superiores às médias decorrentes da exposição ao escuro. Esta informação confirma a influência da luz no processo de germinação, atuando diretamente na velocidade do processo.

Em relação ao teste de tetrazólio, realizado com as sementes que permaneceram hidratadas e intactas ao final do teste de germinação conduzido, foi possível constatar que, aproximadamente 20% das sementes remanescentes dos lotes A e C e 30% das sementes do lote B não estavam viáveis. Os resultados obtidos demonstram que o teste de tetrazólio

(Figura 1C) deve ser utilizado como análise complementar, para verificar a viabilidade das sementes e que, uma das causas da redução dos resultados de germinação foi, provavelmente, a presença de sementes não viáveis.

A exigência de temperaturas alternadas e luz representa uma adaptação de espécies, que, como *S. granulosoleprosum*, contêm sementes pequenas, para assegurar que a germinação ocorra próxima à superfície do solo, em áreas de clareira (Carvalho et al., 2006; Aud e Ferraz, 2012). O fornecimento de luz e temperaturas alternadas nesta situação pode estar associado à superação de imaturidade fisiológica do embrião (Marcos Filho, 2015), balanço de substâncias promotoras e inibidoras (Copeland e McDonald, 2001), além da impermeabilidade do tegumento a gases ou água (Brancalion et al., 2008).

3.3.2 Avaliação da Posição das Sementes no Substrato

Os resultados da avaliação da germinação relacionados à colocação das sementes no substrato entre papel (EP) ou sobre papel (SP), em presença e ausência de luz (Tabela 3), indicaram que há influência positiva da luz para a germinação de *Solanum granulosoleprosum*.

Houve interação significativa entre a posição das sementes no substrato e o fornecimento de luz, para as duas alternâncias de temperatura analisadas. As médias de germinação decorrentes da exposição ao fotoperíodo foram significativamente superiores às obtidas em escuro.

Tabela 3 – Germinação (%) de sementes de *S. granulosoleprosum*, lotes 1, 2 e 3 em função da posição das sementes no substrato, alternância de temperaturas e luz (luz e escuro).

POSIÇÃO	20-30°C						15-35°C					
	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3		LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3	
	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO
Entre Papel	35 ^a A	21 ^a B	31 ^a A	12 ^a B	32 ^a A	8 ^a B	39 ^a A	34 ^a A	44 ^a A	28 ^a B	50 ^a A	36 ^a B
Sobre Papel	33 ^a A	7 ^b B	40 ^a A	2 ^a B	41 ^a A	5 ^a B	36 ^a A	7 ^b B	39 ^a A	7 ^b B	42 ^a A	4 ^b B
CV (%)	23,9		32,8		29,6		22,0		21,3		22,1	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas contíguas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Ao comparar os resultados de germinação obtidos com exposição à luz, verificou-se que não houve diferenças significativas entre as porcentagens de germinação, independentemente da posição das sementes no substrato, da temperatura ou da semente analisados.

Figura 1 - *Solanum granulosoleprosum*: Plântula normal (A), plântulas anormais estioladas (B), semente viável pelo teste de tetrazólio (C) e plântulas anormais com cotilédones amarelos (D)

Uma constatação relevante neste ensaio foi que, apesar das sementes germinarem no escuro, foram obtidas, nesta condição, plântulas apresentando amarelecimento das folhas cotiledonares (Figura 1D), além de plântulas estioladas, com raízes pouco desenvolvidas e cotilédones presos pelo tegumento (Figura 1B), que foram classificadas como plântulas anormais. Características similares foram descritas por Brancalion et al. (2008) em relação à germinação das sementes de *H. popayanensis* no escuro.

A luz, apesar de não ser um elemento essencial à germinação favoreceu o crescimento das plântulas, estimulando o desenvolvimento de suas partes essenciais. A partir desta informação, considerando-se que a ausência de luz pode contribuir para subestimar a qualidade de um lote de sementes de *S. granulosoleprosum*, as demais comparações entre resultados nessa pesquisa (IVG, TMG e utilização do KNO_3) passaram a analisar somente as condições com exposição à luz.

Os resultados de germinação, IVG e TMG das sementes de cada lote analisado, utilizando as diferentes posições no substrato, temperaturas alternadas e exposição ao

fotoperíodo (Tabela 4), indicaram que não houve diferenças estatísticas significativas para a germinação e o IVG.

Tabela 4 - Germinação (%), Índice de Velocidade de Geminção (IVG) e Tempo Médio de Germinação (TMG) de sementes de *S. granulosoleprosum*, lotes 1, 2 e 3, em função da posição das sementes no substrato (entre papel e sobre papel) e alternância de temperaturas, com exposição à luz.

TRATAMENTOS	GERMINAÇÃO (%)			IVG			TMG (DIAS)		
	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3
EP 20-30°C	35*a	31a	32a	0,93a	0,82a	0,89a	21 b	20 b	19 b
EP 15-35°C	39a	44a	50a	0,91a	1,04a	1,21a	23ab	22 b	21 b
SP 20-30°C	33a	40a	41a	0,86a	1,09a	1,11a	21 b	20 b	20 b
SP 15-35°C	36a	39a	42a	0,79a	0,82a	0,88a	25a	25a	27a
CV (%)	20,7	19,5	20,7	19,0	20,4	23,0	7,3	5,6	7,9

*Médias seguidas pela mesma letra entre linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A única variável estudada que apresentou diferença significativa entre os tratamentos foi o TMG, para a qual foram verificados valores superiores para a semeadura Sobre Papel, quando utilizado a 15-35°C, significando que, nesta combinação a germinação demorou mais tempo para ser finalizada. O início da germinação para todos os tratamentos e temperaturas foi observado a partir do 10º dia após a semeadura. Apesar das avaliações terem sido conduzidas até 40 dias após a semeadura, a maior concentração de plântulas normais foi observada no intervalo entre os 15 e 30 dias.

A utilização de semeadura em substrato à base de papel levou em consideração informações encontradas na literatura, a partir de estudos envolvendo germinação de sementes de *S.granulosoleprosum* ou outras solanáceas que citam a utilização de papel como substrato. Fowler e Carpanezzi (1997) sugeriram que o papel mata-borrão poderia ser utilizado como substrato para verificar a germinação das sementes de fumo bravo. Castellani et al. (2009) utilizaram a semeadura sobre papel de filtro para a germinação das sementes de três espécies de solanáceas, inclusive *S. granulosoleprosum*. Lopes e Pereira (2005) concluíram que o substrato à base de papel também pode ser utilizado para avaliar a germinação de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). Este substrato também é recomendado para

sementes de espécies cultivadas, pertencentes à família Solanaceae, como, por exemplo, *Capsicum* spp, *Solanum gilo* e *Solanum melongena* (Brasil, 2009).

Outros fatores pertinentes à rotina de um laboratório de análise de sementes também foram ponderados como a praticidade de manipulação em laboratório, o tamanho e formato das sementes, bem como a facilidade oferecida no momento das avaliações das plântulas. A modalidade sobre papel (SP) é indicada para sementes pequenas ou médias que requerem luz e entre papel (EP) é indicado para sementes pequenas ou médias, pouco exigentes em luz, porém que requerem mais água para germinar (Figliola et al., 1993; Ferraz e Calvi, 2010).

No final dos testes de germinação, as sementes remanescentes de todos os lotes foram avaliadas por meio do teste de terazólio e 5% das sementes não estavam viáveis, sendo esta uma das possíveis causas para não se obter melhores resultados de germinação.

3.3.3 Avaliação da Utilização do Nitrato de Potássio (KNO_3)

Os resultados decorrentes da utilização do nitrato de potássio para umedecer o substrato para o teste de germinação das sementes de *S. granulosoleprosum* (Tabela 5) indicaram que os resultados de germinação foram superiores quando foi utilizada a solução de nitrato de potássio (KNO_3). Este resultado se reproduziu nas amostras dos três lotes analisados, sendo evidenciado, principalmente, quando a semeadura foi realizada Sobre Papel (SP).

É possível constatar que, para as sementes de todos os lotes testados, os resultados de germinação superiores estavam relacionados à utilização de KNO_3 e semeadura sobre papel (SP) a 20-30 e 15-35°C. Na semeadura Entre Papel (EP) a 20-30 °C, a adição de KNO_3 proporcionou efeito positivo somente para a germinação das sementes do lote 3, enquanto que a utilização com EP a 15-35°C não foi eficiente para promover a germinação das sementes testadas.

Tabela 5 - Germinação (%) de sementes de *S. granulosoleprosum*, lotes 1, 2 e 3, em diferentes posições no substrato (entre papel e sobre papel), com alternância de temperaturas, umedecimento do substrato com água ou KNO₃ e exposição à luz.

TRATAMENTOS	GERMINAÇÃO (%)					
	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3	
	H ₂ O	KNO ₃	H ₂ O	KNO ₃	H ₂ O	KNO ₃
EP 20-30°C	50aA*	48abA	54abA	64aA	46abB	60aA
EP 15-35°C	47aA	36 bB	58aA	45 bB	58aA	51aA
SP 20-30°C	32 bB	59aA	36 cB	64aA	33 bB	57aA
SP 15-35°C	33 bB	54aA	37 bcB	63aA	44abB	60aA
CV (%)	14,9		16,9		16,6	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas contíguas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

As porcentagens médias de germinação com utilização de KNO₃, independentemente da semente avaliada e excetuando a semeadura Entre Papel a 15-35°C, variaram de 48 a 64%, resultados próximos aos obtidos em viveiros para as sementes desta espécie, que, de acordo com Souza Junior e Brancalion (2016), são entre 60 e 80%.

Embora os lotes utilizados neste ensaio sejam os mesmos utilizados nos ensaios de avaliação da posição da semente no substrato (Tabela 4), nota-se, principalmente quando foi utilizada semeadura em EP, que os resultados de germinação foram superiores aos obtidos nos ensaios anteriores, mesmo quando foi utilizada somente água para umedecimento do substrato. Como houve um intervalo de cerca de 60 dias entre a finalização dos dois ensaios, estes resultados podem ser atribuídos a dormência, superada paulatinamente durante o armazenamento das sementes.

A dormência fisiológica, causada por mecanismos inibitórios presentes no embrião, associados a processos metabólicos e ao controle do desenvolvimento é o tipo de dormência predominante em algumas espécies de solanáceas, como o tomate e o tabaco (Baskin e Baskin, 2004). Provavelmente trata-se do mesmo tipo de dormência associada às sementes de *S. granulosoleprosum*.

É importante observar que, as sementes utilizadas nestes ensaios só foram submetidas a uma limpeza manual após o recebimento. Provavelmente, a causa do nível de germinação destas sementes é o beneficiamento inadequado e, ou, a utilização das sementes colhidas de frutos imaturos, pois, como afirmaram Castellani et al. (2007), a ação

de morcegos (agentes dispersores) prejudica a obtenção de frutos maduros de *Solanum granulosoleprosum*. Esta informação é relevante, considerando que a colheita de frutos imaturos pode refletir diretamente na formação e na qualidade das sementes obtidas.

Os resultados de IVG (Tabela 6) são compatíveis com os resultados de germinação. Neste caso, as médias obtidas com a utilização de KNO_3 , para as sementes dos três lotes analisados, também foram superiores às observadas quando foi utilizada somente água para o umedecimento do substrato. Esta informação denota que há uma aceleração do processo com a utilização de KNO_3 .

Tabela 6 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes *S. granulosoleprosum*, lotes 1, 2 e 3, em diferentes posições no substrato (entre papel e sobre papel), com alternância de temperaturas, umedecimento do substrato com água ou KNO_3 e exposição à luz.

TRATAMENTOS	IVG					
	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3	
	H_2O	KNO_3	H_2O	KNO_3	H_2O	KNO_3
EP 20-30°C	1,28aB*	1,58 bA	1,69aA	2,13aA	1,22abB	1,94aA
EP 15-35°C	1,10abA	0,87 cA	1,42abA	1,17 bA	1,52aA	1,36 bA
SP 20-30°C	0,86 bB	2,38aA	0,99 bcB	2,38aA	0,95 bB	2,15aA
SP 15-35°C	0,79 bB	1,87 bA	0,81 cB	1,96aA	1,06abB	2,13aA
CV (%)	13,4		19,8		17,8	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas contíguas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A análise dos resultados mostra que, a utilização do KNO_3 na semeadura Sobre Papel à 20-30 °C proporcionou os melhores resultados de IVG para as sementes de todos os lotes testados, seguido pelo SP 15-35 e EP 20-30°C. Estas três combinações de substrato e temperatura não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos resultados observados para os lotes 2 e 3. A semeadura Entre Papel sob 15-35°C apresentou resultados irregulares, a exemplo do que foi verificado no caso da germinação.

Os resultados de TMG (Tabela 7) corroboram as informações relacionadas ao teste de germinação e à avaliação de IVG, uma vez que as médias de tempo obtidas com a utilização de KNO_3 , excetuando-se o tratamento SP 15-35°C, foram significativamente inferiores, para todas as amostras testadas. A redução no tempo médio de germinação está diretamente

relacionada ao aumento da velocidade de germinação, conforme constatado com os dados de IVG.

Tabela 7 - Tempo Médio de Germinação (TMG) de sementes de *S. granulosoleprosum*, lotes 1, 2 e 3, em diferentes posições no substrato (entre papel e sobre papel), com alternância de temperaturas, umedecimento do substrato com água ou KNO₃ e exposição à luz.

TRATAMENTOS	TMG (DIAS)					
	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3	
	H ₂ O	KNO ₃	H ₂ O	KNO ₃	H ₂ O	KNO ₃
EP 20-30°C	21aA*	16 bB	18 cA	16 bA	20aA	17 bB
EP 15-35°C	23aA	22aA	22abA	21aA	20aA	21aA
SP 20-30°C	20aA	13 cB	21 bcA	14 bB	20aA	14 bB
SP 15-35°C	22aA	16 bB	25aA	17 bB	23aA	15 bB
CV (%)	7,0		8,9		9,7	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A exemplo do que foi relatado para os resultados do IVG, a semeadura Sobre Papel a 20-30 °C reduziu os resultados de TMG para todos os lotes testados, seguido pelo SP 15-35 e EP 20-30°C, que não apresentaram diferenças significativas entre os resultados obtidos para as sementes dos lotes 2 e 3 quando o KNO₃ foi utilizado. Esta informação, é muito importante pois, na prática, possibilita abreviar o período do teste em cerca de 5 dias. A semeadura Entre Papel sob 15-35°C apresentou resultados superiores de TMG, não sendo recomendada para utilização em rotina.

Nos ensaios conduzidos nesta pesquisa, o início da germinação ocorreu a partir dos 10 dias após a semeadura, com o maior número de plântulas normais nas avaliações próximas aos 15, 20 e 25 dias, havendo estabilização em torno de 30-35 dias. Apesar de ser uma espécie com germinação lenta, a utilização da alternância de temperatura, da luz e da solução de KNO₃ a 0,2% contribuíram para reduzir o período do teste, comparado ao que foi sugerido por estudos realizados anteriormente com a mesma espécie.

Válio e Scarpa (2001), ao avaliarem a emissão da radícula das sementes de *S. granulosoleprosum* com temperaturas alternadas e fotoperíodo, verificaram que o início da germinação ocorreu 2 a 3 semanas após a instalação do teste e foi estabilizada após 6

semanas. Castellani et al. (2009), analisaram a mesma espécie em condições similares e sugeriram que a primeira contagem do teste de germinação seja realizada aos 37 dias e a finalização aos 60 dias.

O uso do Nitrato de Potássio tem sido recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) para estimular a germinação de uma gama de espécies, incluindo algumas da família Solanaceae, como as cultivadas *Capsicum spp*, *Lycopersicum esculentum* e *Solanum melongena*. Efeito positivo deste sal também foi identificado na germinação de espécies nativas, como *Acnistus arborescens* (Brito et al., 2016) ou mesmo daninhas, como *Solanum nigrum* e *Solanum physalifolium* (Bithel et al., 2002), todas pertencentes à mesma família.

Aparentemente o íon nitrato atua como receptor de elétrons na via pentose-fosfato e na oxidação do NADPH, possibilitando o suprimento de fontes de energia requeridas no início da germinação (Bethke et al., 2007). À exemplo do que foi mencionado para a luz e temperatura, a utilização de nitratos pode ser vista como um mecanismo de adaptação ecológica, pois a proximidade da superfície do solo garante a disponibilidade de luz, nitratos e temperaturas alternadas.

Diante do exposto, os resultados obtidos com esta pesquisa definem condições favoráveis para a germinação das sementes de *S. granulosoleprosum*, reprodutíveis, comparáveis e de fácil utilização nas análises de rotina dos Laboratórios de Análise de Sementes, podendo ser referência para uma proposta de método para o teste de germinação das sementes desta espécie.

3.4 CONCLUSÕES

As condições adequadas para o teste de germinação das sementes de *Solanum granulosoleprosum* são alternância de temperatura 20-30°C, com a distribuição das sementes sobre (SP) ou entre papel (EP), assim como a alternância 15-35°C com a distribuição das sementes sobre (SP), associados ao umedecimento do substrato com solução 0,2% de KNO₃ (para as sementes dormentes) e 8 horas diárias de luz;

Nestas condições, a primeira avaliação do teste de germinação deve ser realizada aos 10 dias após a semeadura e a final aos 35 dias.

REFERÊNCIAS

AUD, F.F.; FERRAZ, I.D.K. Seed size influence on germination responses to light and temperature of seven pioneer tree species from the Central Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n.3, p.759-766, 2012.

ARAUJO NETO, J.C.; AGUIAR, I.; FERREIRA, V.M. Efeito de temperatura e da luz na germinação de sementes de *Acacia polyuphylla* DC. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.249-256, jun, 2003.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v.14, n.1, p.1-6, 2004.

BARBOSA J.C., MALDONADO JR, W. **Experimentação agrônômica & Agroestat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Jaboticabal: Multipress, 2015. 396p.

BETHKE, P. C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R. L. Nitric oxide in seed dormancy and germination. In: BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. (Ed.) **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p.153-175.

BITHELL, S.L.; MCKENZIE, B.A.; BOURDÔT, G. W.; HILL, G.D.; WRATTEN, S.D.; Germination requirements of laboratory stored seeds of *Solanum nigrum* and *Solanum physalifolium*. **New Zealand Plant Protection**, v.55, p.222-227, 2002.

BLACK, M.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. (ed) **The encyclopedia of seeds**: science, technology and uses. Oxfordshire: CABI 2008. 828 p.

BRANCALION, P.H.S.; NOVENBRE, A.D.L.C.; RODRIGUES, R.R.R.; CHAMMA, H.M.C.P. Efeito da luz e de diferentes temperaturas na germinação de sementes de *Heliocarpus popayanensis* L. **Revista Árvore**, Viçosa, v.32, n.2, p.225-232, 2008.

BRANCALION, P.H.S.; NOVENBRE, A.D.L.C.; RODRIGUES, R.R.R.; Temperatura ótima de germinação de sementes de espécies arbóreas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 15-21, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais**. Brasília: CGAL, 97p., 2013.

BRITO, S.F.; BEZERRA, A.M.E., PEREIRA, D.S. Efeito da temperatura e do KNO₃ na germinação de *Acnistus arborescens* (Solanaceae). **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 23, n.3, p.406-412, 2016.

CARVALHO, L.R.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p.15-25, 2006.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. Jaboticabal: Funep, 2012. 590p.

CASTELLANI, E.D.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. Colheita de frutos, extração e beneficiamento de sementes de solanáceas arbóreas. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.17, n.1,2,3 p.69-75, 2007.

CASTELLANI, E.D.; DAMIÃO FILHO, C.F.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. Morfologia de frutos e sementes de espécies arbóreas do gênero *Solanum* L. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.30, n.1, p.102-113, 2008.

CASTELLANI, E.D.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. Bases para a padronização do teste de germinação em três espécies de *Solanum* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n.2, p.077-085, 2009.

COPELAND, L. O.; McDONALD, M. **Principles of seed science and technology**. 4. ed. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2001. 467 p.

FERRAZ, I.D.K., CALVI, G.P. Teste de germinação. In: LIMA JUNIOR, M. J.V. ed. **Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais**. Manaus:UFAM, 2010. p.52-122.

FIGLIOLIA, M. B.; OLIVEIRA, E. C.; PIÑA RODRIGUES, F. C. M. Análise de sementes. In: AGUIAR, I. B; PINA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Ed.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Abrates, 1993. p.137-174.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php&especie=3850. Acesso em 22 ago 2018.

FOWLER, J.A.P.; CARPANEZZI, A.A. Efeitos de substratos e temperaturas na germinação de sementes de *cuvitinga* (*Solanum granuloso-leprosum* Dunal). **Comunicado Técnico Embrapa Florestas**, n.24, p.1-3, 1997.

FREIRE, J. M. ; URZEDO, D. I. ; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. . A realidade das sementes nativas no Brasil: Desafios e oportunidades para a produção em larga escala. **Seed News**, p. 24-28, ago. 2017.

GUEDES, R. S.; ALVES, E.U.; GONÇALVES, E.P.; OLARES, P.N.Q.; MEDEIROS, M.S.; Silva, K. B. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.6, p.997-1003, 2009.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**, Washington: OEA, 1983. 174 p.

LOPES, G.L. Compêndio Digital. Disponível em: <https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/9452-2/>. Acesso em 22 ago 2018.

LOPES, J.C., PEREIRA, M.D. Germinação de sementes de cubiu em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p.146-150, 2005.

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

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2 ed. Londrina: ABRATES. 2015. 659 p.

NOVEMBRE, A.D.L.C.; FARIA, T.C.; PINTO, D.H.V.; CHAMMA, H.M.C.P. Teste de germinação de sementes de sansão-do-campo (*Mimosa caesalpiniaefolia* benth. – Fabaceae-mimosoideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 47-51, 2007.

PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E.; DEL VITTO, L. A. Medicamentos herbarios en el Centro-Oeste Argentino. “Ambay”: controle de calidad de la droga oficial y sus adulterantes. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 17, n. 3, p. 197-212, 1998.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M., MARTINS, R.B. Dormência: Conceito, tipos e formas de superação. In: MORI, E.S., PIÑA-RODRIGUES, F. C. M., FREITAS, N.P. **Sementes florestais-Guia para germinação de 100 espécies nativas**. São Paulo: Instituto Refloresta, 2012. p.19-26.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. 2 ed. Brasília: Agiplan, 1985. 289 p.

SANTOS, M.A.O.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; MARCOS-FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 213-223, 2007.

SARMENTO, M.B.; VILLELA, F.A. Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil. **Informativo Abrates**, Curitiba, v.20, n.1/2, p.39-44, 2010.

SOUZA, R.P.; VÁLIO, I.F.M. Seed Size, Seed Germination, and Seedling Survival of Brazilian Tropical Tree Species Differing in Successional Status. **Biotropica** v.33, n.3, p. 447–45, 2001.

SOUZA JUNIOR, C.N., BRANCALION, P.H.S. **Sementes e Mudás: guia para propagação de árvores brasileiras**. São Paulo: Oficina de Textos, 2016. 463p.

VÁLIO, I.F.M., SCARPA, F.M. Germination of seeds of tropical pioneer species under controlled and natural conditions. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.1, p.79-84, 2001.

VIDAVER, W. Light and seed germination. In: KHAN, A.A. The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Amsterdam, North Holland Publishing Co. p.181-98, 1977.

4 INTERFERÊNCIA DE FUNGOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS NA QUALIDADE DAS SEMENTES DE *Senna alata*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos verificar a interferência dos fungos *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium* do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC), na qualidade das sementes *Senna alata*, bem como a transmissão e sobrevivência destes, quando inoculados nas sementes através da técnica de restrição hídrica. Para tanto, sementes de *Senna alata*, foram inoculadas com estes fungos, pela técnica de restrição hídrica a -1,0 MPa por 24 horas. Posteriormente, as sementes foram avaliadas quanto à sanidade com e sem assepsia com hipoclorito de sódio, à germinação e à emergência da plântula após a inoculação, aos 3 e aos 6 meses após o armazenamento. A técnica da restrição hídrica possibilita a obtenção de sementes portadoras de Aa, FIESC e FPC. Os três fungos interferem na germinação e na emergência da plântula e permanecem em associação com as sementes ao longo do período de armazenamento. Há a transmissão dos fungos das sementes de *S. alata* para as plântulas; os sintomas são morte de sementes, necrose da raiz, estrangulamento do colo das plântulas seguido de tombamento. FIESC e FPC, além de causarem lesões necróticas nos cotilédones, associam-se às plântulas sintomáticas e assintomáticas, avaliadas por meio do teste de emergência da plântula.

Palavras-chave: Sementes florestais; *Fusarium*; *Alternaria*

ABSTRACT

The objective of this work was to verify the interference of the fungi *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium* belonging to the complex of species *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) and *Fusarium pseudocircinatum* (FPC), in the of giant fedegoso (*Senna alata*) seeds, as well as their survival, when inoculated in the seeds by means of the water restriction technique. Seeds of *Senna alata*, were inoculated with these fungi by the water restriction technique at -1.0 MPa for 24 hours. Subsequently, the seeds were submitted to seed health tests, with and without asepsis with sodium hypochlorite, germination and seedling emergence. Evaluations were performed soon after inoculation, at 3 and 6 months after storage. The water restriction technique provides seeds inoculated with Aa, FIESC and FPC. The three fungi interfered with germination and seedling emergence and remained in association with the seeds throughout the storage period. There is the transmission of the fungi from the seeds of *S. alata* to the seedlings; the symptoms are seed death, root necrosis, strangulation of the hypocotil of the seedlings followed by damping off. FIESC and FPC, in addition to causing necrotic lesions on cotyledons, are associated with symptomatic and asymptomatic seedlings, evaluated through the seedling emergence test.

Keywords: Forest seeds; Water restriction; Transmission

4.1 INTRODUÇÃO

Muitas plantas das espécies florestais são multiplicadas por sementes e a sanidade é um aspecto relevante. A ocorrência de patógenos pode causar prejuízos qualitativos e quantitativos. Parte da literatura relata doenças em espécies florestais brasileiras, para as quais os principais problemas ocorrem durante a germinação das sementes e a formação de mudas nos viveiros, decorrentes do uso de técnicas de produção inapropriadas.

A maioria das pesquisas desenvolvidas tem resultado em importantes contribuições para a identificação dos patógenos associados às sementes das diferentes espécies, porém ainda faltam informações sobre os efeitos e os prejuízos causados pelos fungos à germinação das sementes e ao desenvolvimento da plântula

A planta da espécie *Senna alata*, popularmente conhecida como fegegoso-gigante, manjerioba grande, mata pasto ou candelabro, da família Fabaceae Caesalpinoideae, é um arbusto de, aproximadamente, 3 metros de altura, nativa do Brasil, presente em todas as regiões. Pode ser utilizada com finalidades ornamentais e terapêuticas (Lorenzi e Matos, 2008). Possui flores amarelas, reunidas em espigas terminais. Os frutos são do tipo vagem, alados, indeiscentes, castanhos, com numerosas sementes achatadas, de coloração castanha quando maduras (Dantas e Silva, 2013).

Dentre os fatores que afetam a qualidade das sementes, a associação com microrganismos constitui uma preocupação cada vez maior, principalmente nos países tropicais, nos quais as condições climáticas diversificadas ampliam os problemas sanitários (Machado, 2000). Um dos aspectos relevantes para a qualidade das sementes é o sanitário, uma vez que estas constituem em importantes meios de transmissão de patógenos e, como consequência dessa transmissão, pode haver apodrecimento de sementes antes de germinarem, redução do vigor das plântulas, início de epidemias e introdução de patógenos em áreas isentas (Machado, 1987).

A partir da década de 80, as pesquisas abordando a sanidade de sementes de espécies florestais se multiplicaram, pois alguns pesquisadores conscientizaram-se da necessidade de obter informações adicionais sobre as espécies florestais, principalmente as brasileiras.

Diversos gêneros de fungos foram detectados em associação com sementes de espécies florestais, dentre os quais destacam-se *Alternaria*, *Aspergillus* *Colletotrichum*,

Curvularia, *Diplodia*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma* e *Rhizoctonia*. (Carneiro, 1986; Mucci e Lasca 1986; Santos et al., 2000; Santos et al., 2001; Vechiato e Parisi 2013; Holbig et al., 2013, Carmo et al., 2017).

Patógenos podem associar-se às sementes por três maneiras distintas: externamente à semente, infectando a semente e em associação concomitante, onde apenas acompanham o lote de sementes. A contaminação implica na presença do patógeno em mistura ou aderido à superfície das sementes, enquanto que, na infecção o patógeno está presente no interior das sementes (Machado, 1988).

De modo geral, vários prejuízos podem ser causados por patógenos associados às sementes, tais como: morte em pré-emergência, podridão radicular, tombamento de mudas, manchas necróticas em folhas, caules e frutos, hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos, infecções latentes, entre outros (Neergaard, 1979). Todos esses danos causam a redução da produção de mudas em viveiros e o aumento dos custos de reflorestamento (Sales, 1992).

O estudo da associação dos fungos de maior incidência, a frequência em que estão associados às sementes e a avaliação do seu potencial patogênico é essencial, pois pode fornecer subsídios para determinação de modelos epidemiológicos, para produção das mudas e para o armazenamento de sementes (Santos et al., 1997).

Potencialmente, a maioria dos patógenos pode ser transportada por sementes, sem, necessariamente, ser transmitida à plântula. A chance de transmissão aumenta na proporção em que o inóculo se aloja internamente nas sementes (Machado, 1987). A contaminação superficial é a associação mais comum entre os patógenos e as sementes. Geralmente esta contaminação ocorre durante a maturação, a partir do inóculo produzido em diferentes partes da planta e que atinge a semente através de modos distintos, ou mesmo nas diferentes etapas após a colheita da semente (Piveta, 2009).

Segundo Menten e Bueno (1987) o transporte é a disseminação do patógeno pela semente, que pode ser detectado e quantificado por meio dos testes de sanidade. A transmissão implica no transporte do patógeno, que causa uma infecção bem sucedida, originando uma plântula doente e podendo, geralmente, ser quantificada através da detecção de sintomas nas plântulas. Portanto, se não houver transporte não há transmissão, porém pode ocorrer transporte sem que haja transmissão.

Muitos fungos associados às sementes de espécies brasileiras são também agentes causais de doenças em espécies cultivadas. O conhecimento da associação destes organismos com as sementes é apenas a primeira etapa para evitar a livre disseminação. Como etapas complementares, há necessidade de verificar a transmissão pela semente e, caso se confirme, é importante pesquisar se tais organismos causam danos economicamente significativos às plântulas, a ponto de afetar o estabelecimento do estande (Lazarotto, 2010).

As doenças relacionadas à transmissão de fungos por sementes florestais ocorrem durante a fase de formação das mudas (Santos e Parisi, 2011). Dentre os sintomas mais frequentes relatados em viveiros estão o tombamento de mudas, a podridão de raízes e colo, além de manchas foliares e lesões nos cotilédones e caule (Carneiro, 1987; Resende et al. 2008).

As pesquisas com enfoque em patogenicidade, transmissão e danos causados por patógenos às plântulas de espécies florestais, a partir dos isolados das sementes foram mais frequentes nos últimos anos (Dhingra et al., 2002; Machado et al., 2004; Parisi et al., 2005; Botelho et al., 2008; Cherobini et al., 2008; Benetti et al., 2009; Lisboa-Padulla et al., 2009; Lazarotto et al., 2010 ; Lazarotto et al., 2012; Maciel et al., 2012 a e b ; Rego et al., 2012). Os principais efeitos prejudiciais relatados nas sementes são escurecimento, podridão, redução da germinação e do vigor. Nas plântulas causam necrose nas raízes, necroses ou manchas escuras nos primeiros pares de folhas e morte.

A inoculação de fungos em sementes é um artifício utilizado por pesquisadores, com o objetivo de desenvolver estudos envolvendo diferentes aspectos da interação entre o patógeno e o hospedeiro.

De acordo com Alfenas et al. (2016), a inoculação de fungos é uma prática rotineira adotada pelos fitopatologistas e visa o estabelecimento artificial de uma doença na planta. Consiste na transferência de quaisquer estruturas infectivas do patógeno, tais como o micélio (inóculo), do local onde são produzidos para o órgão a ser inoculado. Um dos objetivos deste procedimento é provar a patogenicidade do organismo isolado em cultura pura, de modo a verificar se ele é o agente causal da doença.

Atualmente, para a obtenção de sementes portadoras do fungo de interesse, a técnica da restrição hídrica é utilizada com frequência, uma vez que inibe a germinação das sementes, enquanto em contato com a colônia do fungo, sem afetar o desenvolvimento deste, através da utilização de baixos potenciais hídricos, pela adição de solutos ao substrato

onde o fungo se desenvolverá. Há outras técnicas, como a imersão de sementes em suspensão de conídios e, ou, hifas, o revestimento externo com esporos e o contato das sementes com a colônia fúngica em meio de cultura. Por esses métodos, entretanto, os fungos aderem ao tegumento das sementes e a infecção não é assegurada. (Machado et al., 2001).

O presente trabalho objetivou verificar a interferência dos fungos *Alternaria alternata*, *Fusarium* do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC), na qualidade das sementes de *Senna alata*, bem como a transmissão e sobrevivência destes, quando inoculados nas sementes através da técnica de restrição hídrica.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (22°42'30.8"S e 47°37'47.6"O) e de Análise de Sementes, do Departamento de Produção Vegetal (22°42'11.6"S e 47°37'57.2"O), na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, em Piracicaba, SP e nas dependências do Viveiro Bioflora (22°44'57.1"S e 47°34'39.2"O), em Piracicaba-SP.

4.2.1 Sementes Utilizadas

Para a pesquisa foram utilizadas sementes de fedegoso gigante (*Senna alata*) dos lotes 1, 2, 3 e 4, conforme descrito na Tabela 1. Para todas as análises realizadas, com exceção da determinação do teor de água, foram testadas quatro repetições de 50 sementes, perfazendo um total de 200 sementes por tratamento.

Antes do início das inoculações, sementes de todos os lotes utilizados (Tabela 1) foram submetidas às análises para determinação do teor de água e teste de germinação, seguindo os métodos descritos em 4.2.5.

4.2.2 Obtenção dos Isolados

Os isolados de *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC) utilizados nesta pesquisa são provenientes de sementes de *Senna alata*, naturalmente portadoras, coletadas nos municípios de Penápolis-SP, em 2016 (isolados de Aa e FIESC) e Laranjal Paulista-SP, em 2017 (isolado de FPC).

Para a obtenção dos isolados, pequenas porções de micélio dos fungos, presentes na superfície das sementes por ocasião da avaliação do teste de sanidade, foram transferidas para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA, para posterior obtenção de colônias puras.

A caracterização das espécies foi realizada no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico, SP. O DNA dos isolados foi extraído conforme método descrito por Doyle e Doyle (1987) a partir do micélio cultivado em meio de cultura BDA. A amostra de DNA genômico extraído foi submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA e os genes que permitiram melhor definição das espécies foram o da RNA polimerase 2 (R PB2) para *Alternaria* e o gene do fator de alongação (EF) para *Fusarium*.

Tabela 1- Sementes de *Senna alata*, lotes 1,2,3 e 4, utilizadas para inoculação com *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC).

Identificação	Local de Coleta	Ano de Coleta	Isolado Inoculado
Lote 1	Penápolis - SP	2016	Aa, FIESC
Lote 2	Piracicaba - SP	2017	Aa, FIESC
Lote 3	Rio das Pedras - SP	2017	FPC
Lote 4	Piracicaba - SP	2017	FPC

4.2.3 Superação da Dormência

Para a superação da dormência, as sementes de todos os lotes utilizados foram imersas em ácido sulfúrico (98% p.a.), por 60 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente por 3 minutos (Braga et al., 2010). Na sequência, as sementes foram submetidas à assepsia superficial com hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos e posterior secagem à temperatura ambiente, em recipientes assépticos contendo papel absorvente, por 24 a 30 horas, antes de serem submetidas à inoculação.

4.2.4 Inoculação das Sementes

As sementes de *Senna alata*, dos lotes 1, 2, 3 e 4, previamente submetidas à superação da dormência e assepsia superficial, foram inoculadas separadamente com os isolados Aa, FIESC e FPC (Tabela 1).

A técnica utilizada para a inoculação foi a restrição hídrica do meio de cultura BDA (Machado et al., 2001), com adição do soluto manitol a -1,0 MPa antes da autoclavagem. O cálculo da quantidade de manitol para obtenção deste potencial osmótico (71,2 g/l de BDA) foi realizado por meio do software SPPM (Michel e Radcliffe, 1995), considerando a temperatura de 20°C para o preparo da solução.

As placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 20 ml de meio de cultura BDA + manitol e discos de 0,5 cm de diâmetro do micélio de cada isolado ao centro, foram mantidas, inicialmente, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias (FIESC e FPC) e 10 dias (Aa) de cultivo dos isolados, quando constatada a colonização total da superfície do meio de cultura, as sementes foram distribuídas em camada única em cada placa e levemente pressionadas no substrato, de maneira a aumentar a superfície de contato com o micélio (figura 1C). Na sequência, as placas contendo as sementes foram mantidas nas mesmas condições iniciais por 24 horas (Koch et al., 2017).

Ao final do período de contato, as sementes foram transferidas para recipientes assépticos contendo papel absorvente, onde permaneceram para secagem à temperatura ambiente por 24 a 30 horas. Após a secagem, uma parte das sementes inoculadas foi destinada às análises iniciais e as demais foram acondicionadas em sacos de papel e

armazenadas em câmara climatizada, com temperatura média de 20°C e umidade relativa de 40%, para as avaliações aos 3 e aos 6 meses.

Para verificar a interferência do armazenamento na sobrevivência do inóculo, as sementes inoculadas, juntamente as do controle não inoculado, submetido à assepsia, foram avaliadas em três momentos: logo após a inoculação, aos 3 e aos 6 meses após o armazenamento, quanto ao teor de água, à sanidade e à germinação, conforme indicado a seguir.

4.2.5 Análises em Laboratório e em Casa de Vegetação

Após a inoculação, as sementes foram avaliadas pelas seguintes análises:

Teor de água – determinado para sementes de cada lote pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a). Foram utilizadas 2 subamostras, contendo aproximadamente 2,5 g, para cada lote testado e os resultados das médias obtidas foram expressos em porcentagem (base úmida).

Sanidade – avaliada utilizando o método do papel de filtro com congelamento, conforme descrito no Manual de Análise Sanitária de Sementes (Brasil, 2009b). Dez sementes foram dispostas equidistantemente em placas plásticas de 9 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada. Após a semeadura, as placas foram mantidas sob luz fluorescente em sala à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, por 24 horas. Em seguida, foram transferidas para congelador (-20°C), para inibição da germinação, por 24 horas, e retornadas à sala de incubação inicial, tal como descrito anteriormente, por mais 5 dias, perfazendo um período total de 7 dias. Para a detecção dos fungos, as sementes foram analisadas individualmente, com auxílio de estereomicroscópio com resolução de 30-80X. A cada período testado foram analisadas sementes sem e com assepsia superficial utilizando hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, com o objetivo de verificar se o inóculo estava associado à semente interna ou externamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de incidência de cada espécie detectada, considerada patogênica. Para os cálculos das repetições foram consideradas 5 placas/repetição.

Teste de germinação – Vinte e cinco sementes foram distribuídas em substrato papel toalha, previamente umedecido com água destilada, na proporção de 2,2 vezes a massa do

papel seco. Os rolos foram acondicionados em germinador e mantidos à temperatura constante de 25°C (Hernani e Novembre, 2017). Foram analisadas 4 repetições de 50 sementes para cada amostra testada. As avaliações foram realizadas aos 4 e 8 dias após a semeadura, adaptado das avaliações recomendadas para *Senna multijuga* nas Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (Brasil, 2013). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes não germinadas, de acordo com critérios indicados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a). Para os cálculos das repetições foram consideradas 2 rolos/repetição.

Emergência da plântula – avaliada somente no período inicial, logo após a inoculação das sementes, mediante semeadura em caixas plásticas de 43x30x11 cm, contendo areia autoclavada. As caixas foram mantidas em ambiente telado, utilizado para produção de mudas de espécies nativas, nas dependências do viveiro Bioflora. As avaliações foram realizadas aos 8 e 15 dias após a semeadura, contando-se o número de plântulas emergidas. Os resultados foram expressos em porcentagem de emergência total de plântulas.

Os dados referentes ao teor de água das sementes não foram analisados estatisticamente.

Para as demais análises, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento analisado. Para as análises de sanidade foi adotado, para cada lote, o esquema fatorial de 4 (tratamentos) x 3 (períodos de armazenamento). Para as análises de germinação foi adotado, para cada lote, o esquema fatorial de 2 (tratamentos) x 3 (períodos de armazenamento). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa AgroEstat (Barbosa e Maldonado Jr., 2015).

4.2.6 Verificação da transmissão dos fungos associados às sementes

A transmissão dos fungos inoculados nas sementes de *Senna alata* para as respectivas plântulas foi avaliada juntamente com as análises de germinação e emergência.

Durante as avaliações dos testes de germinação foram anotados os principais sintomas observados. Algumas plântulas apresentando sintomas considerados “típicos” ou recorrentes para cada isolado inoculado foram transferidas do(s) rolo(s) para caixas plásticas transparentes, contendo papel previamente umedecido com água destilada. Estas caixas foram mantidas em sala à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 3 dias, quando então as plântulas foram analisadas, utilizando o estereomicroscópio com resolução de 30-80X e microscópio óptico para identificação dos fungos, por meio da análise das estruturas associadas a cada sintoma.

Ao final das avaliações do teste de emergência, foram coletadas, aleatoriamente, amostras de plântulas sintomáticas e assintomáticas de cada tratamento. As plântulas foram submetidas à assepsia com álcool 70%, seguido de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos. Na sequência, foram dispostas em bandejas plásticas assépticas, contendo papel toalha previamente umedecido com água destilada. Estas bandejas foram cobertas com saco plástico e mantidas em sala à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 3 dias, quando então as plântulas foram analisadas, para identificação dos fungos, por meio observação das estruturas associadas a cada lesão, com o auxílio de estereomicroscópio e microscópio óptico.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Determinação do teor de água das sementes

Os teores de água das sementes de *Senna alata* variaram entre 9,0 e 16,1 % (Tabela 2). Os resultados mais elevados foram observados para as sementes dos lotes 3 e 4 que, logo após o armazenamento atingiram os mesmos níveis identificados para as sementes dos lotes 1 e 2, permanecendo no intervalo de 10 a 12%.

Tabela 2 – Teor de água (%) de sementes de *Senna alata*, (lotes 1, 2, 3 e 4), inoculadas artificialmente com *Fusarium* do complexo de espécies de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), *Alternaria alternata* (Aa) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC) e armazenadas por 6 meses.

TRATAMENTO	PERÍODO DE ARMAZENAMENTO											
	LOTE 1			LOTE 2			LOTE 3			LOTE 4		
	Início	3 Meses	6 Meses	Início	3 Meses	6 Meses	Início	3 Meses	6 Meses	Início	3 Meses	6 Meses
CONTROLE	11,9	12,2	11,1	12,1	11,7	11,0	13,5	11,6	10,2	13,5	11,4	10,3
Aa	12,1	13,1	12,0	11,5	12,5	11,8	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
FIESC	13,5	12,8	12,3	12,5	12,8	12,2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
FPC	n/a ¹	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	15,3	n/d ²	9,0	16,1	11,3	10,2

1- não aplicável ao fungo; 2 – não determinado

Os resultados iniciais da avaliação das sementes, antes de serem submetidas à assepsia e à inoculação, foram entre 10,5 e 11,2%. Portanto, através dos resultados obtidos, constata-se que o método utilizado para inoculação não provocou alterações significativas no teor de água das sementes.

O fato dos resultados dos teores de água não terem variado, mesmo após a inoculação utilizando o contato com as colônias fúngicas, confirma que a utilização da restrição hídrica foi importante para impedir que as sementes absorvessem água em excesso, iniciando o processo de germinação, como também que o período e as condições de secagem pós contato foram apropriadas para permitir que as sementes atingissem um nível adequado de umidade.

Uma ressalva deve ser feita para as sementes dos lotes 3 e 4, que foram inoculadas em época de umidade relativa alta (80%), devido à ocorrência de chuvas no período. Para não haver diferenças no modo de secagem, optou-se, neste caso, por prolongar o período de exposição ao ar para 30 horas, medida que, aparentemente, não foi suficiente para igualar os teores de água aos patamares observados para as sementes dos lotes 1 e 2, que foram inoculados em período com umidade relativa de 60% (LEB/ESALQ/USP, 2019). No entanto, com base nos resultados obtidos posteriormente, as sementes atingiram o equilíbrio higroscópico durante o armazenamento.

Como a variação entre os resultados é mínima e todas as sementes foram mantidas na mesma condição de armazenamento durante a condução dos testes, há possibilidade de afirmar que as diferenças entre os resultados das sementes analisadas não são causadas por variações dos teores de água.

Figura 1 – *Senna alata*: frutos (A), sementes (B), sementes em contato com o micélio de FIESC (C), teste de sanidade de sementes inoculadas com Aa (D), FIESC (E) e FPC (F)

4.3.2 Testes de Sanidade

Os resultados da sanidade das sementes de *S. alata* dos lotes 1 e 2 inoculadas com *Alternaria alternata* (Tabela 3) evidenciaram que a técnica de contato das sementes com a colônia fúngica, utilizando restrição hídrica por 24 horas, foi propícia para a obtenção de sementes portadoras do fungo (Figura 1D).

Tabela 3 - Incidência (%) de *Alternaria alternata* em sementes de *Senna alata*, lotes 1 e 2, inoculadas artificialmente e a armazenadas por 6 meses.

TRATAMENTO	PERÍODO APÓS INOCULAÇÃO					
	LOTE 1			LOTE 2		
	Início	3 Meses	6 Meses	Início	3 Meses	6 Meses
CONTROLE SEM ASSEPSIA	1,5 bA*	1,5 bA	1,5 bA	1,0 bA	2,0 bA	6,5 bA
CONTROLE COM ASSEPSIA	0,0 bA	1,0 bA	0,5 bA	1,0 bA	2,0 bA	6,5 bA
INOCULADO SEM ASSEPSIA	99,5aA	94,0aB	99,0aA	97,0aA	87,5aB	95,0aA
INOCULADO COM ASSEPSIA	99,0aA	96,0aA	99,0aA	96,0aA	89,0aAB	90,0aB
CV (%)	4,0%			8,2%		

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Após a utilização de assepsia não foi constatada diferença significativa entre as incidências das sementes inoculadas, demonstrando que *A. alternata* estava associado internamente às sementes. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para as sementes dos dois lotes pesquisados.

A associação entre o fungo e as sementes persistiu, independentemente do período de armazenamento, ou seja, mesmo aos 6 meses após a inoculação, ainda havia alta porcentagem de sementes infeccionadas, confirmando que, neste caso, houve a sobrevivência do patógeno nas condições de armazenamento utilizadas e que esta técnica de inoculação pode ser empregada visando estudos futuros de qualidade envolvendo tipos de embalagens, tratamentos e condições de armazenamento.

A incidência de *A.alternata* nas sementes do tratamento controle manteve-se estável, sem diferir significativamente ao longo do período de armazenamento. A análise dos resultados obtidos com estas sementes, submetidas ou não à assepsia demonstra que não houve diferença significativa entre a infecção e a contaminação.

Na análise realizada aos 3 meses após a inoculação, foi notado um decréscimo na incidência média nas sementes dos dois lotes analisados, que pode ser atribuído à amostragem ou mesmo ao umedecimento inadequado do substrato, interferindo no desenvolvimento do fungo. Não há possibilidade de controlar todas as variáveis que influenciam a análise de sanidade e, pelo fato da sobrevivência de *A. alternata* nesse

patossistema ser desconhecida, não havia como prever alguma anomalia relacionada ao ensaio no momento da avaliação.

Os resultados das sementes dos lotes 1 e 2, inoculadas com o isolado de *Fusarium* pertencente ao complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) (Tabela 4), indicaram que a inoculação também foi eficiente, resultando em altas porcentagens de incidência (Figura 1E).

Tabela 4 - Incidência (%) de *Fusarium* do complexo *incarnatum-equiseti* (FIESC) em sementes de *Senna alata*, lotes 1 e 2, inoculadas artificialmente e armazenadas por 6 meses.

TRATAMENTO	PERÍODO APÓS INOCULAÇÃO					
	LOTE 1			LOTE 2		
	Início	3 Meses	6 Meses	Início	3 Meses	6 Meses
CONTROLE SEM ASSEPSIA	1,5 bA*	1,5 cA	1,5 bA	2,0 bA	2,5 bA	2,0 bA
CONTROLE COM ASSEPSIA	1,5 bA	1,0 cA	0,5 bA	2,0 bA	2,5 bA	2,0 bA
INOCULADO SEM ASSEPSIA	100aA	94,0aB	91,5aB	100aA	88,0aC	94,0aB
INOCULADO COM ASSEPSIA	98,5aA	82,0 bC	90,0aB	97,5aA	83,5aC	90,5aB
CV (%)		3,6%			5,7%	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A exemplo do observado para *A. alternata*, mesmo após a utilização de assepsia com hipoclorito as incidências encontradas mantiveram-se elevadas.

As sementes controle apresentaram incidência estável, sem diferenças significativas durante o período de armazenamento, ao passo que, para as sementes inoculadas foi constatado um decréscimo tanto na contaminação como na infecção, confirmado pela diferença significativa entre as médias de incidência apresentadas ao longo do intervalo de tempo analisado.

É importante ressaltar que, mesmo tendo apresentado uma redução na incidência, ao final do sexto mês, FIESC foi observado, neste período, em cerca de 90% das sementes inoculadas, resultado que pode ser considerado elevado.

Analogamente ao constatado para *Alternaria alternata* e *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti*, a incidência de *Fusarium pseudocircinatum* (FPC) atingiu porcentagens elevadas após a inoculação das sementes dos lotes 3 e 4 (Tabela 5).

Tabela 5 - Incidência (%) de *Fusarium pseudocircinatum* (FPC) em sementes de *Senna alata*, lotes 3 e 4, inoculadas artificialmente e armazenadas por 6 meses.

TRATAMENTO	PERÍODO APÓS INOCULAÇÃO					
	LOTE 3			LOTE 4		
	Início	3 Meses	6 Meses	Início	3 Meses	6 Meses
CONTROLE SEM ASSEPSIA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA
CONTROLE COM ASSEPSIA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA
INOCULADO SEM ASSEPSIA	100aA	98,0aA	91,5aB	99,5aA	100aA	100aA
INOCULADO COM ASSEPSIA	81,0 bA	67,0 bC	73,5 bB	87,5 bA	91,0 bA	90,5 bA
CV (%)	8,6%			4,8%		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Embora as porcentagens alcançadas tenham resultado em diferença significativa entre as médias obtidas para sementes com e sem assepsia, elas foram relativamente elevadas e a associação do fungo com as sementes persistiu, apresentando incidências estáveis durante o período de armazenamento (Figura 1F). Esse tipo de resultado foi obtido para as sementes dos dois lotes avaliados.

As porcentagens de incidência observadas tanto para FIESC como para FPC após a inoculação foram similares às relatadas por Koch et al. (2017), ao inocular sementes de *Senna alata* com *Fusarium* sp. pelo mesmo período de contato, evidenciando que foi possível reproduzir as condições utilizadas por estes pesquisadores.

Conforme mencionado por Coutinho et al. (2000), a assepsia de sementes com hipoclorito de sódio possibilita diferenciar se o inóculo está associado interna ou externamente, permitindo, através desta informação, uma melhor compreensão sobre a transmissibilidade de patógenos das sementes para as plântulas.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, após a utilização da assepsia com hipoclorito, demonstram que, para as três espécies fúngicas estudadas, a utilização da inoculação pela técnica da restrição hídrica, viabilizou a obtenção de sementes infectadas e que a infecção persistiu em níveis significativos durante todo o período de armazenamento das sementes. Segundo Machado (1988), a semente pode ser considerada infectada quando o patógeno encontra-se alojado no interior dos tecidos.

Alternaria e *Fusarium* fazem parte do grupo de fungos denominados fungos de campo, que se estabelecem nas sementes durante o período de crescimento e maturação, ou seja, antes da colheita. Requerem alta umidade relativa para se desenvolver e geralmente cessam o seu crescimento quando o teor de água da semente e a temperatura de armazenamento são baixos (Wetzel, 1987). Mesmo nas condições adotadas para o armazenamento das sementes, com umidade relativa de 40% e temperatura média de 20°C não foi observado decréscimo acentuado da incidência destes fungos ao longo de 6 meses, demonstrando que, ao se associarem internamente às sementes de *S. alata*, *Alternaria alternata*, FIESC e FPC têm a sua longevidade assegurada por intervalos de tempo que podem superar 6 meses.

De acordo com Holbig et al. (2013) e Santos e Rego (2011), *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. estão entre as principais espécies de fungos transportados pelas sementes de espécies florestais. Têm sido relatados em associação com diferentes espécies brasileiras como, por exemplo, açoita cavalo (Maciel et al., 2013), angico vermelho (Maciel et al., 2012b), aroeira (Araujo et al., 2013), aroeira preta (Piveta et al., 2014), guapuruvu (Cherobini et al., 2010), guajuvira (Walker et al., 2015), ipê amarelo (Fantinel et al., 2013) e paineira (Lazarotto et al., 2010). As incidências detectadas variaram de acordo com fatores como o local de coleta das sementes, o método de detecção utilizado, a região e a época de produção, demonstrando haver uma série de motivos que podem influenciar os resultados obtidos.

Para *Senna alata*, é recomendada a coleta dos frutos direto da árvore, ao atingirem a coloração marrom, quando outros frutos já estiverem começando a se abrir (Souza Junior e Brancalion, 2016). Portanto, há possibilidade que parte das sementes, oriundas dos frutos abertos, caia no solo, sob as árvores, onde poderá ser contaminada por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria* (Santos e Parisi, 2011). Ao serem beneficiadas, estas sementes contaminadas poderão, inclusive, disseminar estes fungos para outras sementes (Ferreira, 1989).

Embora não haja informações sobre a associação de fungos com sementes de *S. alata*, acredita-se que os níveis de incidência elevados obtidos nesta pesquisa sejam importantes para avaliar a interferência das três espécies na qualidade das sementes, seja em ambiente de laboratório ou em viveiro de produção de mudas.

4.3.3 Análises de Germinação

Os resultados dos testes de germinação das sementes de *Senna alata* inoculadas com Aa, FIESC e FPC, apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8 demonstram que não houve interação significativa entre os tratamentos (controle e inoculado) e os períodos de armazenamento, independentemente do fungo inoculado ou do lote utilizado.

As sementes de todos os lotes utilizados (Tabela 1) foram testadas inicialmente quanto à germinação e apresentaram porcentagens de plântulas normais que não ultrapassaram 10%, havendo, em contrapartida porcentagens elevadas de sementes não germinadas, intactas, indicando dormência por impermeabilidade do tegumento.

Segundo Braga et al. (2010), a espécie *Senna alata* apresenta tegumento impermeável dificultando a absorção de água e/ou oxigênio, acarretando resistência física ao crescimento do embrião e, conseqüentemente o atraso na germinação. Em ambiente natural esta dormência é superada pelo calor úmido ou seco, por microrganismos do solo, pela ação de ácidos fortes, pelo desgaste natural do tegumento ou pela ingestão das sementes por animais dispersores (Vazquez-Yanes e Orozco-Segovia, 1993).

Com base nesta informação, foi realizado o tratamento para superação da dormência antes da inoculação, de modo a impedir qualquer interferência do ácido sulfúrico na incidência dos fungos após a inoculação e possibilitar a verificação da interferência dos fungos na germinação e emergência das sementes inoculadas.

É possível verificar que o tratamento utilizado para superação da dormência, previamente à inoculação foi eficaz, promovendo a germinação, como pode ser verificado nos resultados obtidos para as sementes de *S. alata* dos tratamentos controle (Tabelas 6, 7 e 8). Nestes tratamentos foram mencionados resultados superiores a 80% para as sementes dos melhores lotes, estando de acordo com a germinação estimada para esta espécie, que, segundo Souza Junior e Brancalion (2016), seria entre 80 e 100%.

Não houve redução nos resultados de germinação observados para as sementes controle ao longo do período de armazenamento. Ou seja, a imersão das sementes em ácido sulfúrico pelo período de 60 minutos não interferiu negativamente no parâmetro fisiológico das sementes de nenhum dos lotes de *S. alata* armazenadas em câmara com umidade (40%) e temperatura (20°C) controladas. Resultado similar foi relatado para as sementes de

canafístula, quando submetidas ao tratamento de superação de dormência com o mesmo ácido e armazenada por 7 meses em temperaturas de 10°C (Seneme et al., 2012). Tal informação é relevante, pois comprova que há possibilidade de armazenar as sementes após o tratamento e a secagem, permitindo a utilização parcelada sem que haja interferência negativa na qualidade.

De acordo com os resultados de germinação relatados após a inoculação das sementes de *Senna alata* com *Alternaria alternata* (Tabela 6), houve interferência negativa do fungo neste parâmetro.

Tabela 6 – Porcentagem de germinação, plântulas anormais e sementes não germinadas de sementes de *Senna alata*, lotes 1 e 2, inoculadas artificialmente com *Alternaria alternata* (INOC) ou não (CONT) e armazenadas por 6 meses.

PERÍODO	PLÂNTULAS NORMAIS						PLÂNTULAS ANORMAIS						SEMENTES NÃO GERMINADAS					
	LOTE 1			LOTE 2			LOTE 1			LOTE 2			LOTE 1			LOTE 2		
	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média
Início	74	54	64 b*	45	25	35 b	6	11	9a	16	9	13a	20	35	28a	39	66	53a
3 Meses	86	62	74a	52	36	44a	6	8	7a	16	14	15a	8	30	19 b	32	50	41 b
6 Meses	89	73	81a	54	29	42a	5	9	7a	16	20	18a	6	18	12 b	30	51	41 b
Média	83A	63B		50A	30B		6B	9A		16A	14A		11B	28A		34B	56A	
CV(%)	7,4%			11,3%			47,9%			33,9%			28,1%			15,9%		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A redução da porcentagem de plântulas normais pode ser observada a partir da análise inicial, persistindo no decorrer do período de armazenamento, sendo as médias obtidas com a amostra inoculada significativamente inferiores às da amostra controle, tanto para o lote 1 como para o lote 2.

As porcentagens de plântulas normais (Figura 2A) relatadas nas análises iniciais foram inferiores às relatadas nas análises conduzidas aos 3 e aos 6 meses, independente do lote ou tratamento analisados.

A causa de tal resultado foi, provavelmente, a presença de dormência associada às sementes recém colhidas e que não foi superada imediatamente após a utilização do

tratamento, porém somente após o armazenamento. Este argumento baseia-se no fato que, paralelamente ao aumento da porcentagem de germinação (ou plântulas normais) ocorreu a redução na porcentagem de sementes não germinadas, havendo, inclusive, diferenças significativas entre as médias apresentadas na análise inicial e nas demais análises, tanto na categoria plântulas normais, como na de sementes não germinadas.

As diferenças significativas das porcentagens de plântulas anormais obtidas entre as sementes controle e as inoculadas, foram constatadas somente para as sementes do lote 1, porém demonstram que *A. alternata* pode, provocar aumento da porcentagem de plântulas anormais (Figura 2B).

Segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a), na categoria de sementes não germinadas podem ser incluídas sementes duras, mortas, dormentes e vazias. Os resultados das análises, conduzidas após 3 meses de armazenamento, referente às sementes não germinadas, indicaram que havia somente sementes mortas. Como abordado anteriormente, na análise inicial ainda haviam algumas sementes dormentes que, no decorrer do armazenamento passaram a compor as categorias de plântulas normais ou anormais. No entanto, nos resultados relatados a partir do terceiro mês de armazenamento só foram encontradas sementes mortas, independentemente da amostra analisada.

Considerando a diferença significativa entre os resultados de sementes mortas referentes às inoculadas e o respectivo controle, é possível afirmar que *A.alternata* causa a morte de sementes de *Senna alata* (Figura 2C). Ao analisar este aspecto, o fungo é bastante agressivo, ao se desenvolver rapidamente, impedindo que as sementes iniciem a germinação.

Portanto, a partir dos resultados apresentados na tabela 6, é possível afirmar que o fungo *A. alternata* em associação com sementes de *Senna alata* interferiu na porcentagem de plântulas normais, plântulas anormais e sementes mortas, encontradas nos testes de germinação.

Figura 2 – *Senna alata*: plântula normal (A); plântulas anormais devido à interferência de: *A. alternata* (B), FPC (D e E), FIESC (F); semente morta devido à incidência de *A. alternata* (C)

Os resultados de porcentagem de germinação de sementes de *S. alata* inoculadas com *Fusarium* do complexo *incarnatum-equiseti* (FIESC), observados na Tabela 7, evidenciaram que, de maneira similar à mencionada após a inoculação com *A. alternata* (Tabela 6), houve interferência na porcentagem de plântulas normais identificadas. Tal interferência é comprovada pela diferença significativa entre os resultados obtidos para as sementes controle e inoculadas, para os dois lotes pesquisados.

É relevante observar que, como foram utilizadas as sementes dos mesmos lotes para a inoculação de *A. alternata* e FIESC, a germinação apresentou o mesmo padrão, ou seja, houve acréscimo da porcentagem de plântulas normais, com consequente redução da porcentagem de sementes não germinadas a partir dos três meses de armazenamento.

Tabela 7 – Porcentagem de germinação, plântulas anormais e sementes não germinadas de sementes de *Senna alata*, lotes 1 e 2, inoculadas artificialmente com *Fusarium* do complexo *incarnatum-equiseti* (INOC) ou não (CONT) e armazenadas por 6 meses.

PERÍODO	PLÂNTULAS NORMAIS						PLÂNTULAS ANORMAIS						SEMENTES NÃO GERMINADAS					
	LOTE 1			LOTE 2			LOTE 1			LOTE 2			LOTE 1			LOTE 2		
	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média
Início	74	60	67 b*	45	35	40 b	6	4	5a	16	8	12a	20	36	28a	39	57	48a
3 Meses	86	70	78a	52	42	47a	6	7	7a	16	18	17a	8	23	16 b	32	40	36 b
6 Meses	89	70	80a	54	37	46ab	5	6	6a	16	16	16a	6	24	15 b	30	47	39 b
Média	83A	67B		50A	38B		6A	6A		16A	14A		11B	28A		34B	48A	
CV(%)	6,0%			10,6%			57,3%			37,1%			20,1%			16,8%		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Não houve interferência na porcentagem de plântulas anormais verificadas (Figura 2 F), ao passo que, para as sementes mortas (relatadas em sementes não germinadas), diante das diferenças significativas entre as médias do controle e inoculado, é possível verificar a influência de FIESC, atuando de forma similar à observada para *A. alternata*.

Apesar dos resultados das sementes do lote 2 serem inferiores aos observados para as sementes do lote 1, a interferência de *A. alternata* e FIESC pôde ser verificada da mesma maneira. Ou seja, os prejuízos causados tanto por FIESC como Aa podem ser observados, independentemente da qualidade do lote. Por serem agressivos, se desenvolvem rapidamente e causam a morte mesmo das sementes que apresentam melhor qualidade.

Em função dos resultados da germinação de sementes de *S. alata* inoculadas com *Fusarium pseudocircinatum* (Tabela 8), é possível constatar a similaridade entre os resultados obtidos para as sementes controle dos lotes 3 e 4 em relação à germinação, às plântulas anormais e às sementes não germinadas. Para estes lotes, o modelo de germinação verificado acompanhou exatamente o reportado para os lotes 1 e 2 após terem sido submetidos ao tratamento para superação de dormência (Tabelas 6 e 7), ou seja, a porcentagem de plântulas normais constatada inicialmente estava abaixo do resultado obtido a partir de 3 meses após o armazenamento.

Tabela 8 – Porcentagem de germinação, plântulas anormais e sementes não germinadas de sementes de *Senna alata*, lotes 3 e 4, inoculadas artificialmente com *Fusarium pseudocircinatum* (INOC) ou não (CONT) e armazenadas por 6 meses.

PERÍODO	PLÂNTULAS NORMAIS						PLÂNTULAS ANORMAIS						SEMENTES NÃO GERMINADAS					
	LOTE 3			LOTE 4			LOTE 3			LOTE 4			LOTE 3			LOTE 4		
	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média	CONT	INOC	Média
Início	71	59	65 b*	72	40	56 b	8	18	13a	10	14	12a	21	23	22a	18	46	32a
3 Meses	79	64	72a	85	43	64a	9	17	13a	9	24	17a	12	19	16a	6	33	20 c
6 Meses	80	63	72a	77	49	63a	7	17	12a	9	14	12a	13	20	17a	14	37	26 b
Média	77A	62B		78A	44B		8B	17A		9B	17A		15B	21A		13B	39A	
CV(%)	7,6%			7,9%			33,8%			22,0%			33,6%			16,2%		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas na coluna e maiúscula entre colunas contíguas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em relação à inoculação, verificou-se que FPC interferiu não só na porcentagem de plântulas normais e sementes mortas, como constatado para FIESC, como também na porcentagem de plântulas anormais (Figura 2 D e E), demonstrando maior agressividade quando comparado aos fungos abordados anteriormente. Esta afirmação é suportada pelas diferenças significativas observadas entre os resultados das sementes controle e inoculadas, para estas categorias, independentemente do lote em questão.

A morte de sementes (Figura 2C), observada nos resultados dos testes de germinação com as sementes inoculadas e causada pelos três fungos pesquisados, ocorre devido à rapidez de desenvolvimento e agressividade apresentada, que, através da ação de enzimas e toxinas, impedem o início da germinação (Menten, 1995).

4.3.4 Testes de Emergência

Os resultados de emergência total (Tabela 9), contabilizando todas as plântulas de *Senna alata* emergidas, em ambiente utilizado para produção quotidiana de mudas, corroboram as informações expostas nos testes de germinação, realizados em laboratório.

Alternaria alternata, interferiu na emergência total dos lotes 1 e 2, seguindo o padrão relatado para o teste de germinação, tendo como característica principal causar a morte de sementes, refletindo no resultado observado.

Tabela 9 – Emergência total (%) de plântulas de *Senna alata* a partir de sementes inoculadas artificialmente com *Alternaria alternata*, *Fusarium do complexo incarnatum-equiseti* e *Fusarium pseudocircinatum*.

TRATAMENTO	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>		<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	
	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4
CONTROLE	82a*	35a	82a	35a	69a	65a
INOCULADO	62 b	17 b	64 b	31a	58a	39 b
CV (%)	14,2	17,3	12,5	12,2	11,0	12,0

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A interferência de *Fusarium do complexo incarnatum-equiseti* (FIESC) só foi confirmada para o lote 1, que apresentou resultados significativamente diferentes entre a amostra controle e a inoculada. Para o lote 2, apesar da interferência não ter sido verificada, é possível que parte das plântulas computadas na emergência total pudessem atuar como agentes de disseminação de inóculo, considerando que, conforme exposto nos resultados de transmissão, tanto FIESC como FPC foram encontrados em associação com plântulas aparentemente assintomáticas (Figura 3C).

Em relação a *Fusarium pseudocircinatum* (FPC), a interferência direta do fungo na emergência total só foi verificada para o lote 4. Como foi mencionado anteriormente, diante dos resultados de germinação (Tabela 8), esta espécie de *Fusarium* pode causar anormalidade nas plântulas, além da morte de sementes. Ou seja, é possível que parte das plântulas contabilizadas na emergência total não tivessem exibido sintomas aparentes, porém apresentassem sistema radicular enfraquecido e escurecido, características que poderiam enquadrá-las na categoria de plântulas anormais, caso o teste tivesse sido conduzido em ambiente de laboratório.

Os resultados observados, para os patossistemas discutidos, tanto em laboratório, durante a condução dos testes de germinação, como em viveiro, na condução dos ensaios de emergência (Figura 3 B e E), confirmam que fungos de campo, como *Alternaria* e *Fusarium*, quando associados às sementes podem causar morte de sementes, tombamento ou debilitação de plântulas, assim como relatado por Menten (1995). O tipo e intensidade do

prejuízo causado pode ser influenciado pela localização do inóculo na semente e pelas condições ambientais oferecidas.

Figura 3 – *Senna alata*: plântula normal aos 15 dias após a semeadura (A); tombamento de plântulas em viveiro devido à interferência de FIESC (B), plântulas assintomáticas (C) e sintomáticas (D) com presença de FPC e plântulas com sintomas causados por Aa (E).

4.3.5 Verificação da transmissão dos fungos associados às sementes

Para a verificação da transmissão de *Alternaria alternata*, FIESC e FPC das sementes para as plântulas de *Senna alata* a partir do teste de germinação, foram analisadas as plântulas anormais que exibiram algum tipo de sintoma, bem como as sementes mortas, encontradas durante a avaliação dos testes de germinação, uma vez que as plântulas normais não apresentaram sinais de desenvolvimento fúngico (Figura 2 A).

Os sintomas observados nos ensaios de germinação conduzidos para *Alternaria alternata*, *Fusarium* do complexo *incarnatum-equiseti* e *Fusarium pseudocircinatum* quando em associação com sementes de *S. alata* foram morte de sementes, necrose na raiz, estrangulamento do colo das plântulas, seguido de tombamento (Figura 2 B, C, D, E e F). Para FIESC e FPC também foram observadas lesões necróticas nos cotilédones (Figura 2 D e

F). Os sintomas reportados estão diretamente relacionados aos sintomas atribuídos a estes fungos na literatura.

A transmissão de *Alternaria* sp por sementes foi relatada em outras espécies florestais como açoita cavalo (Maciel et al., 2013), cedro (Cherobini et al., 2008), cedro rosa (Vilela, 2015), ipês amarelo e roxo (Botelho et al., 2008 e Fantinel et al., 2013), além de paineira (Lazarotto et al., 2010). Os sintomas reportados foram morte de sementes, necrose nos cotilédones, redução do tamanho da raiz e tombamento.

Algumas espécies florestais já foram objeto de pesquisa e obtiveram a confirmação da transmissão de *Fusarium* sp. através de suas sementes como, por exemplo, açoita cavalo (Maciel et al., 2013), angico vermelho (Maciel et al., 2012b), aroeira vermelha (Maciel et al., 2012a) cedro (Lazarotto et al., 2012), guajuvira (Walker et al., 2016), ipês amarelo e roxo (Botelho et al., 2008), paineira (Lazarotto et al., 2010) e pinus (Maciel et al., 2017). Os sintomas descritos foram podridão de sementes, má formação do sistema radicular, podridão de raízes, tombamento, amarelecimento, murcha e redução na germinação e emergência.

Tabela 10 – Transmissão de *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium do complexo incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC) verificada a partir de plântulas sintomáticas e assintomáticas de *S. alata* coletadas no ensaio de emergência.

TRATAMENTO	ASSINTOMÁTICAS		SINTOMÁTICAS	
	Nº PLÂNTULAS ¹	Nº POSITIVOS ²	Nº PLÂNTULAS	Nº POSITIVOS
L1 CONTROLE	12	0	n/a ³	n/a
L1 INOC. Aa	12	0	8	7
L1 INOC. FIESC	12	0	8	6
L2 CONTROLE	9	0	n/a	n/a
L2 INOC. Aa	9	0	7	7
L2 INOC. FIESC	11	2	5	5
L3 CONTROLE	8	0	n/a	n/a
L3 INOC. FPC	11	4	9	9
L4 CONTROLE	9	0	n/a	n/a
L4 INOC. FPC	11	5	7	7

1 – Nº total de plântulas observadas; 2 – Nº de plântulas com presença do fungo após a incubação; 3- n/a: não aplicável ao tratamento

De acordo com os resultados de transmissão verificados a partir do ensaio de emergência em casa de vegetação (Tabela 10), a presença de todos os fungos foi confirmada, aliados às plântulas sintomáticas coletadas (Figura 3D). Os sintomas observados foram similares aos relatados nos testes de germinação e demonstram que podem ser reproduzidos mesmo em condições de viveiro, onde predominaram alternância de temperatura e fotoperíodo, ambiente que diverge do oferecido nos testes de germinação em laboratório, no qual as temperaturas foram constantes e favoráveis ao desenvolvimento de *S. alata*.

Tanto FIESC como FPC foram relatados em plântulas assintomáticas, nas quais aparentemente não haviam sinais da presença destes fungos (Figura 3C). Situação semelhante foi reportada por Ishizuka (2016) ao pesquisar a transmissão de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* do solo para plântulas de feijoeiro. Esta informação é relevante pois elucida que estes fungos podem estar latentes, porém presentes no viveiro, sendo disseminados a partir destas plântulas, inclusive para áreas isentas, além de servirem de foco para contaminações futuras.

Um dos isolados de *Fusarium* utilizados nesta pesquisa foi identificado como sendo integrante do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC). Este complexo agrupa cerca de 40 espécies morfológicamente semelhantes, (*F.equiseti* / *F.incarnatum*), porém separadas de acordo com análises filogenéticas e concordância genealógica. Atualmente somente três binômios latinos podem ser aplicados com confiança a este complexo de espécies: *F. lacertarum*, *F. scirpi* e *F. equiseti* (O'Donnell et al. 2009, 2012, 2015).

Outras espécies de *Fusarium*, pertencentes ao mesmo complexo, foram relatadas em associação com sementes e mudas, como é o caso de *Fusarium equiseti* causando necrose foliar e murcha em pecã (Lazarotto et al., 2014) e *F. lacertarum* causando tombamento em casuarina (Favaretto et al., 2018).

Fusarium pseudocircinatum foi isolado a partir de podridões do caule em plantas de baunilha (Pinaría et al., 2010) e também foi relatado como sendo um dos agentes causais da doença conhecida como malformação, em mogno (*Swietenia macrophylla*), causando brotações laterais e encurtamento de internós em mudas desta espécie (Santillán- Mendoza et al., 2018).

O presente trabalho é o primeiro relato dos fungos *Alternaria alternata*, *Fusarium pseudocircinatum* e *Fusarium* pertencente ao complexo FIESC associados às sementes de *Senna alata*. Estes fungos podem ser introduzidos em viveiros de produção de mudas pelas sementes, causar interferência na germinação e emergência, além de serem transmitidos às plântulas, sem, necessariamente, exibirem sintomas aparentes.

4.4 CONCLUSÕES

A utilização da técnica de restrição hídrica possibilita a obtenção de sementes de *Senna alata* portadoras de *Alternaria alternata* (Aa), *Fusarium* do complexo *incarnatum-equiseti* (FIESC) e *Fusarium pseudocircinatum* (FPC), com incidências elevadas, após 24 horas de contato, independentemente do lote utilizado;

Os fungos Aa, FIESC e FPC permanecem associados às sementes de *S. alata* durante pelo menos 6 meses de armazenamento e causam interferência na porcentagem de germinação e emergência dos lotes inoculados;

Há a transmissão de Aa, FIESC e FPC das sementes de *S. alata* para as plântulas. Os sintomas observados são morte de sementes, necrose da raiz, estrangulamento do colo das plântulas seguido de tombamento. FIESC e FPC, além de causarem lesões necróticas nos cotilédones, associam-se às plântulas sintomáticas e assintomáticas presentes no teste de emergência.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, R.F. Inoculação de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos em Fitopatologia**. 2ed Viçosa: UFV, 2016. cap.5, p.123-143.
- ARAÚJO, E.R.; ANDRADE, L.A.; RÊGO, E.R.; GONÇALVES, E.P.; ARAÚJO, E. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de aroeira produzidas no estado da Paraíba. **Agrotec**, v. 34, n. 1, p 9–20, 2013.

BARBOSA J.C.; MALDONADO JR. W. **Experimentação agrônômica & Agroestat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Jaboticabal: Multipress, 2015. 396p.

BENETTI, S. C.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; JACCOUD FILHO, D. S.; Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira** , v. 29, n. 58, p. 81-85, 2009.

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

BRAGA, L. F.; SOUSA, M.P.; BRAGA, J.F.; DELACHIAVE, M.E.A. Escarificação ácida, temperatura e luz no processo germinativo de sementes de *Senna alata* (L.) Roxb. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p.1-7, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009a. 399p.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais**. Brasília: CGAL, 2013. 97p.

CARMO, A. L. M.; MAZARATTO, E. J.; ECKSTEIN, B.; SANTOS, A. F. Associação de Fungos com Sementes de Espécies Florestais Nativas. **Summa Phytopathologica**, n. 3, p.246-247, 2017.

CARNEIRO, J.S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.557-566, 1986.

CARNEIRO, J.S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.17, p.386-394.

CHEROBINI, E. A. I.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2008.

CHEROBINI, E. A. I.; LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; GIRARDI, L.B.; LIPPERT, D.B.; MACIEL, C.G. Qualidade de sementes e mudas de *Schizolobium parahyba* procedentes do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. **Cerne**, v. 16, n. 3, p. 407-413, 2010.

COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A.; MACHADO, J. C.; FREITAS-SILVA, O.; PENA, R. C. M.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.3, p.552-555, 2000.

DANTAS, M. M.; SILVA, M. J. O gênero *Senna* Mill. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cassieae) no Parque Estadual da Serra Dourada, GO, Brasil. **Hoehnea**, v.40, n.1 p.99-113, 2013.

DHINGRA, O.D.; MAIA, C.D.; MESQUITA, J.B. Seedborne pathogenic fungi that affect seedling quality of red angico (*Anadenanthera macrocarpa*) trees in Brazil. **Phytopathology**, v.150, p.451-55, 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15, 1987.

FANTINEL, V.S.; OLIVEIRA, L.M.; MUNIZ, M.F.B.; ROCHA, E.C. Detecção de fungos e transmissão de *Alternaria alternata* via sementes de ipê-amarelo, *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. Ex DC) Mattos. **Revista de Ciências Ambientais**, v.7, n.2, p. 05-14, 2013.

FAVARETTO, R.F.; MUNIZ, M.F.B.; POLETTO, T.; KRAHN, J.R.T.; FANTINEL, V.S.; RABUSKE, J.E.; SARZI, J.S. Morphological, physiological and molecular characterization of *Fusarium lacertarum* causal agent of damping-off in *Casuarina equisetifolia*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.13, n.2, p.1-6, 2018.

FERREIRA, F.A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: UFV, SIF, 1989. 570 p.

HERNANI, T. K.; NOVENBRE, A.D.L.C. Avaliação da temperatura e do substrato para o teste de germinação das sementes de *Senna alata*. **Informativo Abrates**, v.27, n.2, 2017, p.236.

HOLBIG, L.S.; AVELAR, S.A.G; GADOTTI, G.I.; SALINAS, J.C.T.; ZANATTA, G.C.N. Fungos associados a sementes de espécies florestais. In: SCHUCH, L.O.B; VIEIRA, J.F.; RUFINO, C.A.; ABREU JÚNIOR, J.S. **Sementes: produção, qualidade e inovações tecnológicas**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2013. cap.4, p. 87-118.

ISHIZUKA, M.S. **Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico em sementes de feijão para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. 2016. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KOCH, E.F.A.; FRIGO, P.; MORAES, M. H. D. Inoculação de sementes de fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*) e fedegosa (*Senna alata*) com *Fusarium* sp. sob diferentes períodos de contato. **Informativo Abrates**, v.27, n.2, 2017, p.323.

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

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; 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**, v. 22, n. 3, p. 493-503, 2012.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, R. F. DOS; BLUME, E. First report of *Fusarium equiseti* associated on Pecan (*Carya illinoensis*) seeds in Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.6, p.847-847, 2014.

LEB/ESALQ/USP Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba,SP. Departamento de Engenharia de Biosistemas
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP Disponível em:
<http://www.leb.esalq.usp.br/leb/postocon.html>. Acesso em 25 jan. de 2019.

LISBOA-PADULLA, T.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M.; BARBEDO, C.J. Tratamento de sementes de pau-brasil com fungicidas: efeito na incidência de fungos, germinação e transmissão de fungos pelas sementes. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.2, p.148-150, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.; **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p

MACHADO, A.A.; MUNIZ, M.F.B.; HOPE, J.M.; CAMARGO, R. Incidência de fungos causadores de “damping off” em caixeta (*Schefflera morototonii* (Aubl.) Dec) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub.) **Fitopatologia Brasileira**, V.29, p.X, 2004. (suplemento).

MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.1, p.3-15.

MACHADO, J.C.; **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC-ESAL-FAEPE,1988, 106p.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: PS/UFLA/FAEPE, 2000, 137p.

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

MACIEL, C. G.; FERRERA, T. S.; BOVOLINI, M. P.; GONZATTO, S.; MUNIZ, M. F. B.; BURIOL, G. A. Transmissão de fungos via semente e patogenicidade de *Pestalotiopsis* sp. em mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, suplemento 1, p. 2767-2774, 2012 a.

MACIEL, C.G., MUNIZ, M.F.B., SANTOS, A.F. DOS., LAZAROTTO, M. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho). *Summa Phytopathologica*, v.38, n.4, p.323-328, 2012 b.

MACIEL, C. G.; SOUZA, L. B.; BOVOLINI, M. P.; BRUM, D.L.; MUNIZ, M. F. B.; BURIOL, G. A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açaite-cavalo (*Luehea divaricata*). **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 75, p. 331-338, 2013.

MACIEL, C. G.; WALKER, C.; SANTOS, R.F.; MUNIZ, M. F. B.; BRUM, D.L. *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* associated with damping-off in *Pinus* spp. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1 p. 134-141, 2017.

MENTEN, J. O. M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p.115-136.

MENTEN, J.O.M.; BUENO, J.T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.7, p.164-191.

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

MUCCI, E.S.M.; LASCA, C.C. Flora fúngica de sementes de essências florestais nativas. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n.2, p. 352-353, 1986.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: Mac Millan Press, 1979, v.1, 839 p.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G.; GUEIDAN, C.; CROUS, P.W.; GEISER, D.M. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-equiseti* and *F. chalmydosporum* species complexes within the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.12, p.3851–3861, 2009.

O' DONNELL, K.; HUMBER, R.A.; GEISER, D.M.; KANG, S.; PARK, B.; ROBERT, V.; CROUS, P.W.; JOHNSTON, P.R.; AOKI, T.; ROONEY, A.P.; REHNER, S.A. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and Fusarium MLST. **Mycologia**, v. 104, p.427–445, 2012.

O' DONNELL, K.; WARD, T. J.; ROBERT, V.A.R.G.; CROUS, P.W.; GEISER, D.M.; KANG, S. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions **Phytoparasitica**, v.43, p.583–595, 2015.

PARISI, J.J.D; ANDRADE, F.A.; COUTINHO, E.L.; BOTOSSO, M.C.; MARTINS, M.C.; SALES, W.R.M. Qualidade sanitária de sementes e mudas de espécies arbóreas nativas do Estado de São Paulo. **Informativo Abrates**, v.15, n.1,2,3, 2005.

PINARIA, A.G.; LIEW, E.C.Y.; BURGESS, L.W. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. **Australasian Plant Pathology**, v. 39, n.2, p.176-183, 2010.

PIVETA, G. **Influência dos métodos de superação da dormência: qualidade fisiológica, sanitária e transmissão de *Alternaria alternata* em sementes de *Lithrea molleoides* e *Senna macranthera***. 2009. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B.; REINIGER, L.R.S.; DUTRA, C.B.; PACHECO, C. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de aroeira-preta (*Lithraea molleoides*) submetidas a métodos de superação de dormência. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 2, p. 289-297, 2014.

REGO, S. S.; SANTOS, A. F.; NOGUEIRA, A. C.; KUNIYOSHI, Y. S. Detection, transmission and pathogenicity of fungi on *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. Seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n.1, p. 009-013, 2012.

RESENDE, M.L.V.; PÁDUA, M.A.; TOYOTA, M. Manejo das Doenças Associadas a Viveiros Florestais. In: DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A. (Ed.). **Produção de Sementes e Mudas de Espécies Florestais**. Lavras: UFLA, 2008. cap.4, p.141-151.

SALES, N.L.P. Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão. 1992. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTILLÁN-MENDOZA, R.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S. P.; O'DONNELL, K.; PLOETZ, R. C.; ORTEGA-ARREOLA, R.; VÁZQUEZ-MARRUFO, G.; BENÍTEZ-MALVIDO, J.; MONTERO-CASTRO, J.C.; SOTO-PLANCARTE, A.; RODRÍGUEZ-ALVARADO, G. A novel disease of big-leaf mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. **Plant Disease**, v.102, n.10, p.1965-1972, 2018.

SANTOS, A.F.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**, v.30, n.1/2, p.129-138, 2000.

SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S.; SANTANA, D.L.Q. Fungos associados às sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica. Colombo, **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.42, p.51-60, 2001.

SANTOS, A.F.; 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. (Ed. Técnicos). **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. cap.3. p. 37-48.

SANTOS, A.F.; REGO, S.S. Hospedeiros, métodos de detecção e fungos encontrados em sementes florestais. In: SANTOS, A.F.; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. (Ed. Técnicos). **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. cap.9. p. 115-187.

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

SENEME, A.M.; POSSAMAI, E.; VANZOLINI, S.; MARTINS, C.C. Germinação, qualidade sanitária e armazenamento de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium*). **Revista Árvore**, v.36, n.1, p.01-06, 2012.

SOUZA JUNIOR, C.N.; BRANCALION, P.H.S. **Sementes e Mudas: guia para propagação de árvores brasileiras**. São Paulo: Oficina de Textos, 2016. 463p.

WALKER, C.; MACIEL, C.G.; MILANESI, P.M.; MUNIZ, M.F.B.; MEZZOMO, R.; POLLET, C.S. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, p. 463-473, 2016

WALKER, C.; MEZZOMO, R.; MACIEL, C.G.; MUNIZ, M.F.B.; ARAUJO, M.M. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Cordia americana* coletadas na planta e no solo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.10, n.1, p. 259-262, 2015.

WETZEL, M.M.V.S. Fungos do armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S.(Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.9, p.260-275.

VAZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.24, p.69- 97, 1993.

VECHIATO, M.H.; PARISI, J.J.D. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. **Biológico**, v.75, n.1, 2013.

VILELA, A.C.M. **Diversidade, sanidade, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de duas espécies florestais nativas da floresta Atlântica**. 2015. 75 f. Dissertação (mestrado) –Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro.

5 INTERFERÊNCIA DE *Fusarium* DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) NA QUALIDADE DAS SEMENTES DE *Solanum granulosoleprosum*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos verificar a interferência de *Fusarium* pertencente ao complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) na qualidade das sementes de fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*), bem como sua sobrevivência, quando inoculado nas sementes através da técnica de restrição hídrica. Para tanto, sementes de dois lotes de *S. granulosoleprosum*, espécie utilizada em programas de restauração, foram inoculadas com dois isolados de FIESC, pela técnica de restrição hídrica a -1,0 MPa por 24 horas. Posteriormente, as sementes foram avaliadas quanto à sanidade com e sem assepsia com hipoclorito de sódio e à germinação após a inoculação, aos 3 e aos 6 meses após o armazenamento. A técnica de restrição hídrica possibilita a obtenção de sementes portadoras de FIESC, porém há redução da incidência ao longo do período de armazenamento. Os isolados de *Fusarium* do complexo FIESC não causam interferência na germinação das sementes inoculadas, porém são transmitidos das sementes para as plântulas causando a morte de sementes, plântulas com cotilédones presos pelo tegumento, estrangulamento do hipocótilo, má formação da raiz, hipocótilo com encharcamento e necrose nos cotilédones.

Palavras-chave: Sementes florestais; Restrição hídrica; Transmissão

ABSTRACT

This work was carried out aiming to check the interference of *Fusarium* belonging to the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) on the quality of wild smoke (*Solanum granulosoleprosum*) seeds, as well as its survival when inoculated through the water restriction technique. Seeds from two lots of *S. granulosoleprosum*, a species used in restoration programs, were inoculated with two FIESC isolates by the water restriction technique at -1.0 MPa for 24 hours. Subsequently, the seeds were submitted to seed health tests by blotter test method, with and without asepsis with sodium hypochlorite and germination. Evaluations were performed shortly after inoculation, at 3 and 6 months after storage. The use of water restriction technique provides FIESC-bearing seeds, but there is a decrease in the incidence over the storage period. *Fusarium* isolates from the FIESC complex do not cause interference in the germination of the inoculated seeds, but are transmitted from the seeds to the seedlings causing seed death, cotyledon seedlings trapped by the seed coat, hypocotyl strangulation, root malformation, hypocotyl with watersoaked lesions and necrosis on the cotyledons.

Keywords: Forest seeds; Water restriction; Transmission

5.1 INTRODUÇÃO

Muitas plantas das espécies florestais são multiplicadas por sementes e a sanidade é um aspecto relevante. A ocorrência de patógenos pode causar prejuízos qualitativos e quantitativos. Parte da literatura relata doenças em espécies florestais brasileiras, para as quais os principais problemas ocorrem durante a germinação das sementes e a formação de mudas nos viveiros, decorrentes do uso de técnicas de produção inapropriadas.

A maioria das pesquisas desenvolvidas tem resultado em importantes contribuições para a identificação dos patógenos associados às sementes das diferentes espécies, porém ainda faltam informações sobre os efeitos e os prejuízos causados pelos fungos à germinação das sementes e ao desenvolvimento da plântula.

A planta da espécie *Solanum granulosoleprosum*, conhecida como fumo bravo, fumeiro ou gravitinga, da família Solanaceae tem sido utilizada regularmente em programas de restauração de áreas degradadas, como espécie de recobrimento. É uma árvore, podendo atingir até 12 metros de altura, nativa, com flores brancas e roxas e fruto do tipo baga (Lopes, 2018; Flora Digital RS, 2018). As sementes são elipsoides, com superfície do tegumento levemente brilhante, de coloração amarela quando viáveis. (Castellani et al., 2008)

Dentre os fatores que afetam a qualidade das sementes, a associação com microrganismos constitui uma preocupação cada vez maior, principalmente nos países tropicais, nos quais as condições climáticas diversificadas ampliam os problemas sanitários (Machado, 2000). Um dos aspectos relevantes para a qualidade das sementes é o sanitário, uma vez que estas constituem em importantes meios de transmissão de patógenos e, como consequência dessa transmissão, pode haver apodrecimento de sementes antes de germinarem, redução do vigor das plântulas, início de epidemias e introdução de patógenos em áreas isentas (Machado, 1987).

A partir da década de 80, as pesquisas abordando a sanidade de sementes de espécies florestais se multiplicaram, pois alguns pesquisadores conscientizaram-se da necessidade de obter informações adicionais sobre as espécies florestais, principalmente as brasileiras.

Diversos gêneros de fungos foram detectados em associação com sementes de espécies florestais, dentre os quais destacam-se *Alternaria*, *Aspergillus* *Colletotrichum*,

Curvularia, *Diplodia*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma* e *Rhizoctonia*. (Carneiro, 1986; Mucci e Lasca 1986; Santos et al., 2000; Santos et al., 2001; Vechiato e Parisi 2013; Holbig et al., 2013, Carmo et al., 2017).

Patógenos podem associar-se às sementes por três maneiras distintas: externamente à semente, infectando a semente e em associação concomitante, onde apenas acompanham o lote de sementes. A contaminação implica na presença do patógeno em mistura ou aderido à superfície das sementes, enquanto que, na infecção o patógeno está presente no interior das sementes (Machado, 1988).

De modo geral, vários prejuízos podem ser causados por patógenos associados às sementes, tais como: morte em pré-emergência, podridão radicular, tombamento de mudas, manchas necróticas em folhas, caules e frutos, hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos, infecções latentes, entre outros (Neergaard, 1979). Todos esses danos causam a redução da produção de mudas em viveiros e o aumento dos custos de reflorestamento (Sales, 1992).

Potencialmente, a maioria dos patógenos pode ser transportada por sementes, sem, necessariamente, ser transmitida à plântula. A chance de transmissão aumenta na proporção em que o inóculo se aloja internamente nas sementes (Machado, 1987). A contaminação superficial é a associação mais comum entre os patógenos e as sementes. Geralmente esta contaminação ocorre durante a maturação, a partir do inóculo produzido em diferentes partes da planta e que atinge a semente através de modos distintos, ou mesmo nas diferentes etapas após a colheita da semente (Piveta, 2009).

Segundo Menten e Bueno (1987) o transporte é a disseminação do patógeno pela semente, que pode ser detectado e quantificado por meio dos testes de sanidade. A transmissão implica no transporte do patógeno, que causa uma infecção bem sucedida, originando uma plântula doente e podendo, geralmente, ser quantificada através da detecção de sintomas nas plântulas. Portanto, se não houver transporte não há transmissão, porém pode ocorrer transporte sem que haja transmissão.

Muitos fungos associados às sementes de espécies brasileiras são também agentes causais de doenças em espécies cultivadas. O conhecimento da associação destes organismos com as sementes é apenas a primeira etapa para evitar a livre disseminação. Como etapas complementares, há necessidade de verificar a transmissão pela semente e,

caso se confirme, é importante pesquisar se tais organismos causam danos economicamente significativos às plântulas, a ponto de afetar o estabelecimento do estande (Lazarotto, 2010).

As doenças relacionadas à transmissão de fungos por sementes florestais ocorrem durante a fase de formação das mudas (Santos e Parisi, 2011). Dentre os sintomas mais frequentes relatados em viveiros estão o tombamento de mudas, a podridão de raízes e colo, além de manchas foliares e lesões nos cotilédones e caule (Carneiro, 1987; Resende et al. 2008).

As pesquisas com enfoque em patogenicidade, transmissão e danos causados por patógenos às plântulas de espécies florestais, a partir dos isolados das sementes foram mais frequentes nos últimos anos (Dhingra et al., 2002; Machado et al., 2004; Parisi et al., 2005; Botelho et al., 2008; Cherobini et al., 2008; Benetti et al., 2009; Lisboa-Padulla et al., 2009; Lazarotto et al., 2010 ; Lazarotto et al., 2012; Maciel et al., 2012 a e b; Rego et al., 2012). Os principais efeitos prejudiciais relatados nas sementes são escurecimento, podridão, redução da germinação e do vigor. Nas plântulas causam necrose nas raízes, necroses ou manchas escuras nos primeiros pares de folhas e morte.

A inoculação de fungos em sementes é um artifício utilizado por pesquisadores, com o objetivo de desenvolver estudos envolvendo diferentes aspectos da interação entre o patógeno e o hospedeiro.

De acordo com Alfenas et al. (2016), a inoculação de fungos é uma prática rotineira adotada pelos fitopatologistas e visa o estabelecimento artificial de uma doença na planta. Consiste na transferência de quaisquer estruturas infectivas do patógeno, tais como o micélio (inóculo), do local onde são produzidos para o órgão a ser inoculado. Um dos objetivos deste procedimento é provar a patogenicidade do organismo isolado em cultura pura, de modo a verificar se ele é o agente causal da doença.

Atualmente, para a obtenção de sementes portadoras do fungo de interesse, a técnica da restrição hídrica é utilizada com frequência, uma vez que inibe a germinação das sementes, enquanto em contato com a colônia do fungo, sem afetar o desenvolvimento deste, através da utilização de baixos potenciais hídricos, pela adição de solutos ao substrato onde o fungo se desenvolverá. Há outras técnicas, como a imersão de sementes em suspensão de conídios e, ou, hifas, o revestimento externo com esporos e o contato das sementes com a colônia fúngica em meio de cultura. Por esses métodos, entretanto, os

fungos aderem ao tegumento das sementes e a infecção não é assegurada. (Machado et al., 2001).

O presente trabalho objetivou verificar a interferência do fungo *Fusarium* pertencente ao complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) na qualidade das sementes *Solanum granulosoleprosum*, bem como sua transmissão e sobrevivência, quando inoculado nas sementes, através da técnica de restrição hídrica.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (22°42'30.8"S e 47°37'47.6"O) e de Análise de Sementes, do Departamento de Produção Vegetal (22°42'11.6"S e 47°37'57.2"O), na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

5.2.1 Sementes Utilizadas

Para a pesquisa foram utilizadas sementes de fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*) dos lotes 1 e 2 colhidos em Piracicaba-SP, em 2017.

Para as análises realizadas, com exceção da determinação do teor de água, foram testadas quatro repetições de 50 sementes, perfazendo um total de 200 sementes por tratamento.

Antes do início das inoculações, as sementes dos dois lotes utilizados foram submetidas às análises para determinação do teor de água e teste de germinação, seguindo os métodos descritos em 5.2.4.

5.2.2 Obtenção dos Isolados

Os isolados de *Fusarium*, pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), utilizados nesta pesquisa são provenientes de sementes de *S. granulosoleprosum*, naturalmente portadoras, coletadas nos municípios de Capão Bonito, em 2016 e Piracicaba, em 2017.

Para a obtenção dos isolados, pequenas porções de micélio, presentes na superfície das sementes durante a avaliação da sanidade, foram transferidas para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA, para posterior obtenção de colônias puras.

A caracterização das espécies foi realizada no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico – SP. O DNA dos isolados foi extraído conforme método descrito por Doyle e Doyle (1987) a partir do micélio crescido em meio de cultura BDA. A amostra de DNA genômico extraído foi submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA e o gene que permitiu melhor definição da espécie foi gene do fator de elongação (EF) para *Fusarium*.

5.2.3 Inoculação das Sementes

Inicialmente as sementes dos dois lotes de *S. granulosoleprosum* utilizados foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, para desinfestação superficial, e posterior secagem à temperatura ambiente, em recipientes assépticos contendo papel absorvente, por aproximadamente 24 horas.

Após este período, as sementes foram inoculadas separadamente com os isolados F1 e F2, por meio da técnica de restrição hídrica do meio de cultura BDA (Machado et al., 2001), com adição do soluto manitol a -1,0 MPa. antes da autoclavagem. O cálculo da quantidade de manitol para obtenção deste potencial osmótico (71,2 g/l de BDA) foi realizado por meio do software SPPM (Michel e Radcliffe, 1995), considerando a temperatura de 20°C para o preparo da solução.

As placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 20 ml de meio de cultura BDA + manitol e discos de 0,5 cm de diâmetro do micélio de cada isolado ao centro, foram mantidas, inicialmente, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias de cultivo, quando constatada a colonização total da superfície, as sementes foram distribuídas em camada única em cada placa e levemente pressionadas no substrato, de maneira a aumentar a superfície de contato com o micélio (Figura 1 A). Na sequência, as placas contendo as sementes foram mantidas nas mesmas condições iniciais por 24 horas (Koch et al., 2017).

Ao final do período de contato, as sementes foram transferidas para recipientes assépticos contendo papel absorvente, onde permaneceram para secagem à temperatura

ambiente por 24 a 30 horas. Após a secagem, uma parte das sementes inoculadas foi destinada às análises iniciais e as demais foram acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara climatizada, com temperatura média de 20°C e umidade relativa de 40%, para avaliações aos 3 e aos 6 meses.

Para verificar a interferência do armazenamento na sobrevivência do inóculo, as sementes inoculadas e as do controle, não inoculado e submetido à assepsia, foram avaliadas em três momentos: logo após a inoculação, aos 3 e aos 6 meses após o armazenamento, quanto ao teor de água, à sanidade e à germinação, conforme indicado a seguir.

5.2.4 Análises em Laboratório

Após a inoculação, as sementes foram avaliadas pelas seguintes análises:

Teor de água – determinado para sementes de cada lote pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a). Foram utilizadas 2 subamostras, contendo aproximadamente 0,2 g, para cada amostra testada e os resultados das médias obtidas foram expressos em porcentagem (base úmida).

Sanidade – avaliada utilizando o método do papel de filtro, conforme descrito no Manual de Análise Sanitária de Sementes (Brasil, 2009b). Vinte e cinco sementes foram dispostas equidistantemente em placas plásticas de 9 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada. Em seguida, foram incubadas sob luz branca fluorescente, em sala à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. Foram analisadas 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento testado. Para a detecção dos fungos, as sementes foram analisadas individualmente com auxílio de estereomicroscópio com resolução de 30-80X. A cada período testado foi analisada uma amostra com e outra sem assepsia superficial, com o objetivo de verificar se o inóculo estava associado à semente interna ou externamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de incidência. Para os cálculos das repetições foram consideradas 2 placas/repetição.

Teste de germinação – Cinquenta sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel mata-borrão, umedecidas com solução de nitrato de potássio (KNO_3) a 0,2%, em

quantidade equivalente a 2,3 vezes a massa do papel seco, mantidas em caixas plásticas (11 x 11 x 3 cm) transparentes. Em seguida, as caixas foram colocadas em germinador, mantido à temperatura alternada de 20-30°C e 8h fotoperíodo. Foram analisadas 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento testado. As avaliações foram realizadas a partir de 10 dias após a semeadura, a cada 5 dias, até o 35º dia. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes não germinadas, seguindo critérios indicados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a).

Os dados referentes ao teor de água das sementes não foram analisados estatisticamente.

Para as demais análises, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com esquema fatorial de 3 (tratamentos) x 3 (períodos de armazenamento) e 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento analisado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa AgroEstat (Barbosa e Maldonado Jr, 2015).

5.2.5 Verificação da transmissão dos fungos associados às sementes

A transmissão dos fungos inoculados nas sementes de *S. granulosoleprosum* para as respectivas plântulas foi avaliada juntamente com o teste de germinação.

Durante as avaliações dos testes de germinação foram anotados os principais sintomas observados. Algumas plântulas apresentando sintomas considerados “típicos” ou recorrentes para cada isolado inoculado foram transferidas do teste para caixas plásticas transparentes, contendo papel previamente umedecido com água destilada. Estas caixas foram mantidas em sala à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 3 dias, quando então as plântulas foram analisadas, utilizando o estereomicroscópio e microscópio óptico para identificação dos fungos, por meio da análise das estruturas associadas a cada plântula.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 – Determinação do teor de água das sementes

Os teores de água das sementes de *Solanum granulosoleprosum* inoculadas variaram entre 6,5 e 7,9% (Tabela 1).

Tabela 1 – Teor de água (%) em sementes de dois lotes de *S. granulosoleprosum* inoculadas artificialmente com dois isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e armazenadas por 6 meses.

TRATAMENTO	PERÍODO DE ARMAZENAMENTO					
	LOTE 1			LOTE 2		
	Início	3 Meses	6 Meses	Início	3 Meses	6 Meses
CONTROLE	6,9	7,2	6,5	7,0	7,1	6,5
ISOLADO F1	7,5	7,3	6,9	6,8	7,6	6,9
ISOLADO F2	7,4	7,9	6,6	6,7	7,5	6,6

Os resultados dos teores de água não tiveram variações, mesmo após a inoculação utilizando o contato com as colônias fúngicas, confirmando que a utilização da restrição hídrica foi importante para impedir que as sementes absorvessem água em excesso, iniciando o processo de germinação, como também que o período e as condições de secagem pós contato foram apropriados para permitir que as sementes atingissem um nível adequado de umidade.

É importante observar que os teores de água encontrados inicialmente para as sementes dos lotes utilizados, antes de serem submetidas à assepsia e inoculação, foram 7,3 e 7,2% respectivamente, para os lotes 1 e 2. Portanto, através da comparação entre os resultados obtidos antes e após a inoculação verifica-se que a utilização da restrição hídrica para a inoculação não provocou alterações no teor de água das sementes.

Como a variação entre os resultados obtidos é mínima e todas as sementes foram mantidas na mesma condição de armazenamento durante a condução dos testes, há possibilidade de afirmar que as diferenças obtidas entre os resultados das sementes analisadas não são causadas por variações dos teores de água.

Figura 1 – *S. granulosoleprosum*: sementes em contato com o micélio de FIESC (A) e micélio de FIESC na superfície das sementes (B)

5.3.2 Testes de Sanidade

Os resultados da sanidade das sementes do lote 1 após inoculação (Tabela 2) demonstram que o método de contato com a colônia fúngica utilizando restrição hídrica por 24 horas foi adequado para promover o aumento na incidência de FIESC nas sementes, para os dois isolados utilizados (Figura 1B).

Tabela 2 - Incidência (%) de dois isolados do complexo de espécies de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) em sementes de *S. granulosoleprosum*, lote 1, com e sem assepsia, inoculadas artificialmente e armazenadas por 6 meses.

TRATAMENTO	PERÍODO APÓS INOCULAÇÃO								
	Início			3 Meses			6 Meses		
	Sem Assepsia	Com Assepsia	Média	Sem Assepsia	Com Assepsia	Média	Sem Assepsia	Com Assepsia	Média
CONTROLE	2,0*	1,5	1,8 b	2,0	0,0	1,0 b	2,0	0,0	1,0 b
ISOLADO F1	24,5	18,0	21,3a	18,6	3,0	10,8a	7,0	1,5	4,3ab
ISOLADO F2	18,5	17,0	17,8a	19,0	2,6	10,8a	11,5	0,0	5,8a
Média	15,3A	12,2B		13,2A	1,9B		6,8A	0,5B	
CV (%)	41,8								

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas contíguas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A inoculação aumentou a incidência de FIESC em níveis moderados (cerca de 20%) e similares para os dois isolados (F1 e F2), porém os resultados foram estatisticamente superiores aos do controle. Não foi verificada interação significativa entre a utilização de assepsia e os isolados inoculados, demonstrando que tanto F1 como o F2 estabeleceram o mesmo tipo de associação com as sementes.

A aplicação prévia do hipoclorito nas sementes, possibilitou determinar que o contato com as colônias favoreceu a associação não só externa, como também interna entre ambos isolados do fungo e as sementes, principalmente no período inicial. Segundo afirmaram Coutinho et al. (2000), a assepsia de sementes com hipoclorito de sódio possibilita diferenciar se o inóculo está associado interna ou externamente, permitindo, através desta informação, uma melhor compreensão sobre a transmissibilidade de patógenos das sementes para as plântulas.

De acordo com as incidências obtidas ao longo do período de armazenamento (3 e 6 meses), para as sementes com e sem assepsia, houve um decréscimo gradual na infecção, inclusive para as sementes controle, já a partir do terceiro mês, reduzindo-se a níveis próximos de zero no sexto mês. Tal decréscimo também foi observado para a contaminação, porém de forma menos acentuada, considerando que a média dos resultados de incidência sem assepsia no mesmo período foi 6,8%.

Esta informação demonstra que, a exemplo do que foi verificado entre fungos e sementes de diversas espécies, o tipo de associação que predomina é a contaminação das sementes. Segundo Machado (1988), o fato do patógeno estar em mistura ou aderido à semente, caracteriza a contaminação, enquanto que a semente é considerada infectada quando o patógeno encontra-se alojado no interior dos tecidos.

Tabela 3 - Incidência (%) de dois isolados do complexo de espécies de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) em sementes de *S. granulosoleprosum*, lote 2, com e sem assepsia, inoculadas artificialmente e armazenadas por 6 meses.

TRATAMENTO	PERÍODO APÓS INOCULAÇÃO (MESES)								
	Início			3 Meses			6 Meses		
	Sem Assepsia	Com Assepsia	Média	Sem Assepsia	Com Assepsia	Média	Sem Assepsia	Com Assepsia	Média
CONTROLE	4,0*	1,5	2,8 b	4,0	0,0	2,0 b	4,0	1,0	2,5a
ISOLADO F1	25,0	15,5	20,3a	18,0	3,5	10,8a	13,0	0,5	6,8a
ISOLADO F2	17,0	16,5	16,8a	25,0	3,0	14,0a	14,5	1,5	8,0a
Média	15,3A	11,2B		15,7A	2,2B		10,5A	1,0B	
CV (%)	50,8								

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

As mesmas considerações tecidas em relação à sanidade das sementes do lote 1, também podem ser aplicadas às sementes do lote 2. Com base nos resultados obtidos (Tabela 3), apesar da inoculação ter propiciado o aumento da incidência em níveis moderados para os dois isolados utilizados, a contaminação prevaleceu e o armazenamento causou a redução do inóculo associado às sementes.

O decréscimo na contaminação observado ao longo do tempo de armazenamento, independentemente do lote ou isolado analisados, demonstra que o armazenamento em condições adequadas e favoráveis à manutenção da qualidade das sementes, ou seja, aliando baixas temperaturas (20°C) ao baixo teor de água das sementes (em torno de 7,0%), pode atuar na redução do inóculo associado a estas. Fungos do gênero *Fusarium* são considerados fungos de campo e tendem a desaparecer em poucos meses, quando as condições de umidade da semente e temperatura do armazém forem baixas (Wetzel, 1987).

Esperavam-se porcentagens de incidências mais elevadas nesta pesquisa, em virtude dos resultados apontadas por Koch et al. (2017) para o mesmo patossistema. Estes pesquisadores observaram 74 e 39%, respectivamente, de contaminação e infecção ao utilizarem a técnica da restrição hídrica para inoculação das sementes de *S. granulosoleprosum*. Tal resultado pode ser atribuído à qualidade das sementes utilizadas pelos pesquisadores, principalmente no que diz respeito ao teor de água das sementes inoculadas, que pode ter influenciado os resultados obtidos.

De qualquer maneira é complexo avaliar se os níveis detectados no presente estudo correspondem aos verificados naturalmente, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura de associação entre *Fusarium* pertencente ao FIESC e sementes de *Solanum granulosoleprosum*. Num único registro, Brant (2015) mencionou a incidência de 1,5% de *Fusarium* sp. nas sementes de fumo bravo recém colhidas.

Fusarium está entre os principais gêneros de fungos transportados pelas sementes de espécies florestais. Tem sido relatado em associação com outras espécies brasileiras como, por exemplo, ipês amarelo e roxo (Botelho et al., 2008), fava d'anta (Araujo et al., 2009), cedro (Benetti et al., 2009), açoita cavalo, araçá, corticeira, pau jacaré e rabo de bugio (Carmo et al., 2017), guajuvira (Walker et al., 2015), paineira (Lazarotto et al., 2010), angico vermelho (Maciel et al., 2012b) e cajerana (Aimi et al., 2016). As porcentagens de incidência detectadas variaram em função da espécie, método de detecção, emprego de assepsia, local de produção e local de coleta das sementes, demonstrando que há uma série de variáveis que podem interferir nos resultados obtidos.

No caso particular de *Solanum granulosoleprosum*, devido à predação intensiva que ocorre por morcegos ao longo do ciclo de produção, raramente são encontrados frutos caídos no chão (Castellani et al., 2007), limitando a possibilidade de contato com fungos de solo como fonte de contaminação.

Esta informação é relevante, tomando-se por base que fungos do gênero *Fusarium* são considerados importantes fungos de solo, capazes de parasitar sementes e mudas de espécies florestais (Resende et al., 2008). A contaminação ou infecção das sementes de *S. granulosoleprosum*, além do inóculo produzido em diferentes partes da planta, está, neste caso, condicionada também às etapas pós colheita, durante o beneficiamento e armazenamento (Ferreira, 1989).

5.3.3 Testes de Germinação

Os resultados de germinação (porcentagem de plântulas normais), das sementes dos dois lotes de *Solanum granulosoleprosum* inoculados artificialmente (Tabela 4) demonstraram que a assepsia com hipoclorito causou redução de aproximadamente 5 % na germinação inicial, uma vez que as sementes utilizadas como controle apresentaram resultados de 52 e 55% respectivamente, para os lotes 1 e 2, antes de serem submetidas à assepsia.

Tabela 4 - Porcentagem de plântulas normais (PN), anormais (PA), anormais infeccionadas (PAI) e sementes não germinadas (SNG) de sementes de dois lotes de *S. granulosoleprosum* inoculadas artificialmente com dois isolados de *Fusarium* do complexo de espécies *incarnatum-equiseti* (FIESC) e analisadas inicialmente (IN), aos 3 (3M) e aos 6 (6M) meses de armazenamento.

TRATAMENTO	PN (%)								PA (%)							
	LOTE 1				LOTE 2				LOTE 1				LOTE 2			
	IN	3M	6M	Média	IN	3M	6M	Média	IN	3M	6M	Média	IN	3M	6M	Média
CONTROLE	48	39	66	51a*	48	42	47	46a	0	6	6	4a	7	8	4	6a
ISOLADO F1	46	38	56	47a	62	50	51	54a	0	3	4	2a	1	5	5	4a
ISOLADO F2	48	54	52	51a	41	49	52	47a	1	5	4	3a	1	7	5	4a
Média	47B	44B	58A		50 A	47A	50A		0B	5A	5A		3B	7A	5AB	
CV (%)	18,5				23,5				64,1				74,3			

TRATAMENTO	PAI (%)								SNG (%)							
	LOTE 1				LOTE 2				LOTE 1				LOTE 2			
	IN	3M	6M	Média	IN	3M	6M	Média	IN	3M	6M	Média	IN	3M	6M	Média
CONTROLE	3	3	5	4a	2	5	3	3a	49	52	23	41a	43	45	46	45a
ISOLADO F1	7	6	4	6a	1	4	3	3a	47	53	36	45a	36	41	41	39a
ISOLADO F2	3	2	6	4a	6	1	3	3a	48	39	38	42a	52	43	40	45a
Média	4A	4A	5A		3A	3A	3A		48A	48A	32B		44A	43A	42A	
CV (%)	77,2				88,4				20,3				23,7			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Redução na germinação após a utilização de assepsia, porém de forma mais acentuada, também foi relatada para as sementes de ipê amarelo e ipê roxo (Botelho et al., 2008).

Mesmo após esta redução na germinação, os resultados médios obtidos (em torno de 50%) não ficaram muito distantes da germinação estimada para esta espécie em viveiro, que seria a partir de 60% (Souza Junior e Brancalion, 2016).

Embora os ensaios tenham sido conduzidos com sementes recém colhidas, é importante considerar que o parâmetro fisiológico tem influência, dentre outros fatores, do local, da época de produção, do estágio de maturação dos frutos e do manejo adotado após a coleta.

Apesar de *S. granulosoleprosum* produzir frutos o ano todo, a colheita ocorre principalmente de agosto a outubro (Castellani et al., 2007). Nos demais meses do ano, em função da maior predação por morcegos associada à menor produção de frutos, os frutos são colhidos em diferentes estádios de desenvolvimento, com reflexos negativos na germinação e na dormência. Souza Junior e Brancalion (2016) afirmaram que, como os frutos desta espécie permanecem esverdeados até o final da maturação, a coleta deve ser realizada quando as sementes estiverem bem formadas.

Através dos dados obtidos e analisados estatisticamente nota-se que não houve interação significativa entre os tratamentos e os períodos de armazenamento. Ou seja, mesmo logo após a inoculação (análise inicial), quando ambos isolados de FIESC estavam associados externa e internamente às sementes em porcentagens mais expressivas (Tabelas 2 e 3), não ocasionaram interferência na germinação.

Não foi verificada diferença significativa nos resultados obtidos, para nenhum dos dois lotes pesquisados, entre as sementes inoculadas com os dois isolados (F1 e F2) e os respectivos controles, segundo os parâmetros avaliados de porcentagem de plântulas normais, plântulas anormais, plântulas anormais infeccionadas e sementes não germinadas. Tal constatação confirma que, nem sempre a associação de fungos com sementes causa interferência no parâmetro fisiológico.

Apesar de não haver interferência na germinação, foram observadas, em todas as análises conduzidas, plântulas anormais infeccionadas, com sintomas e sinais da presença de FIESC (Figura 2 B, C e D). Como estas plântulas foram identificadas inclusive nas análises das

sementes controle, para as quais, a porcentagem de infecção encontrada foi muito baixa ou nula (Tabelas 2 e 3), constata-se que tanto o inóculo associado interna como externamente foi transmitido para estas plântulas.

Em relação ao lote 1, foi verificada diferença significativa entre as médias de porcentagem de plântulas normais obtidas 6 meses após o armazenamento. Os resultados foram superiores aos observados nas análises anteriores, realizadas logo após a inoculação e aos 3 meses após o armazenamento. Essa variação nos resultados pode ser justificada pela presença de sementes dormentes neste lote e que tiveram a dormência superada ao longo do período de armazenamento.

A diferença observada nos dados de plântulas normais ocasionou, consequentemente, a variação na porcentagem de sementes não germinadas constatadas para o lote 1 no mesmo período de análise. Esta variação confirma a presença de dormência, uma vez que na categoria de sementes não germinadas estão agrupadas sementes duras, mortas, dormentes e vazias (Brasil, 2009a), na categoria de sementes não germinadas estão contidas sementes duras, mortas, dormentes e vazias.

Embora as condições ambientais dos testes de germinação (temperatura alternada 20-30°C e 8h fotoperíodo) não sejam exatamente as mesmas condições de incubação do teste de sanidade (20 ± 2°C e 12h fotoperíodo), acredita-se que estas não tenham sido empecilho ao desenvolvimento de FIESC, levando em consideração que, como a duração do ensaio de germinação foi de 35 dias, haveria tempo hábil para o crescimento do fungo. Cabe observar que as condições proporcionadas no teste de germinação são similares às dos viveiros de produção de mudas, onde há naturalmente a alternância da temperatura e fotoperíodo, em decorrência da presença de dias e noites.

5.3.4 Verificação da transmissão dos fungos associados às sementes

Para a verificação da transmissão de FIESC das sementes para as plântulas de *S. granulosoleprosum* foram analisadas as plântulas anormais infeccionadas e as sementes mortas, obtidas durante a avaliação do teste de germinação, uma vez que as plântulas normais (Figura 2 A) não apresentaram sinais de desenvolvimento fúngico.

Figura 2: *Solanum granulosoleprosum*: plântula normal (A), plântulas anormais com cotilédones presos pelo tegumento, estrangulamento do hipocótilo e má formação de raiz (B), plântula anormal com necrose nas bordas do cotilédone (C), plântula anormal com encharcamento do hipocótilo (D) e semente morta devido à interferência de FIESC (E).

Além das sementes mortas (Figura 2E), os principais sintomas observados, foram plântulas com cotilédone preso pelo tegumento, estrangulamento do hipocótilo e má formação de raiz (Figura 2B), hipocótilo hialino, com encharcamento (Figura 2D) além de necrose nos cotilédones (Figura 2C). Estes sintomas estão diretamente relacionados às principais doenças atribuídas aos fungos do gênero *Fusarium* como podridão de sementes, tombamento de mudas, podridões de raízes e colo, manchas foliares e lesões nos cotilédones e caule (Carneiro, 1987; Resende et al. 2008; Vecchiato e Parisi, 2013).

Como a transmissão implica na transferência do patógeno da semente para a plântula, podendo, geralmente, ser verificada através da detecção de sintomas (Menten e Bueno, 1987), as evidências obtidas demonstram que, apesar de FIESC não ter causado interferência no parâmetro fisiológico de sementes de *Solanum granulosoleprosum*, foi transmitido pelas sementes. Esta informação é relevante pois indica que o fungo pode ter sua disseminação e sobrevivência assegurada pela associação com as sementes.

Considerando que a etapa inicial de produção de mudas em viveiros florestais para algumas espécies é realizada pela semeadura em canteiros com areia, utilizada

ininterruptamente, as sementes portadoras podem atuar com veículo de introdução e de potencialização do inóculo nestas estruturas.

Os isolados utilizados nesta pesquisa foram identificados como sendo integrantes do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC). Este complexo agrupa cerca de 40 espécies morfológicamente semelhantes, (*F.equiseti* / *F.incarnatum*), porém separadas de acordo com análises filogenéticas. Somente três binômios latinos podem ser aplicados com confiança a este complexo de espécies até o momento: *F. lacertarum*, *F. scirpi* e *F. equiseti* (O'Donnell et al. 2009, 2012, 2015).

Outras espécies de *Fusarium*, pertencentes ao mesmo complexo, foram relatadas em associação com sementes e mudas, como é o caso de *Fusarium equiseti* causando necrose foliar e murcha em pecã (Lazarotto et al., 2014) e *F. lacertarum* causando tombamento em casuarina (Favaretto et al., 2018).

Diferentes isolados de *Fusarium* pertencentes ao FIESC foram identificados como sendo os agentes causais de doenças em espécies cultivadas como o pimentão, da família Solanaceae (Ramdial et al., 2017) e o amendoim (Thirumalaisamy et al., 2018). Os principais sintomas descritos por estes pesquisadores foram lesões encharcadas nas folhas ou no fruto, necrose das margens das folhas e murcha, demonstrando similaridade com alguns dos sintomas descritos em plântulas de *S. granulosoleprosum* (Figura 2 C e D) do presente estudo.

O presente trabalho é o primeiro relato de associação de *Fusarium* pertencente ao FIESC com as sementes de *S. granulosoleprosum* e mostra que as sementes desta espécie podem atuar como veículo de introdução e de potencialização do inóculo em viveiros de produção de mudas, sem, no entanto, haver interferência do fungo no parâmetro fisiológico das sementes.

5.4 CONCLUSÕES

A utilização da técnica de restrição hídrica possibilita a obtenção de sementes de *Solanum granulosoleprosum* portadoras de *Fusarium* (FIESC), após 24 horas de contato, independentemente do lote ou isolado utilizado;

Há redução da incidência dos dois isolados de FIESC a partir do terceiro mês de armazenamento das sementes de *S. granulosoleprosum*;

Os isolados de *Fusarium* do complexo FIESC não causam interferência na germinação das sementes inoculadas;

Há a transmissão de FIESC das sementes de *S. granulosoleprosum* para as plântulas. Os sintomas observados são a morte de sementes, plântulas com cotilédones presos pelo tegumento, estrangulamento do hipocótilo, má formação da raiz, hipocótilo com encharcamento e necrose nos cotilédones.

REFERÊNCIAS

AIMI, S.C.; ARAUJO, M.M.; MUNIZ, M.F.B.; WALKER, C. Teste de sanidade e germinação em sementes de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p. 1361-1370, 2016.

ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, R.F. Inoculação de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos em Fitopatologia**. 2ed Viçosa: UFV, 2016. cap.5, p.123-143.

ARAUJO, A.V.; SALES, N.L.P.; FERREIRA, I.C.P.V.; BRANDÃO JUNIOR, D.; MARTINS, E.R. Germinação, vigor e sanidade de sementes de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) obtidas de frutos coletados no solo e na planta. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n.2, p.170-175, 2009.

BARBOSA J.C.; MALDONADO JR W. **Experimentação Agronômica & Agroestat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Jaboticabal: Multipress, 2015. 396p.

BENETTI, S. C.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; JACCOUD FILHO, D. S.; Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 29, n. 58, p. 81-85, 2009.

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

BRANT, H.S.C. **Qualidade das sementes e emergência da plântula de espécies de recobrimento para restauração de florestas estacionais semidecíduais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009a. 399p.

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

CARMO, A. L. M.; MAZARATTO, E. J.; ECKSTEIN, B.; SANTOS, A. F. Associação de Fungos com Sementes de Espécies Florestais Nativas. *Summa Phytopathologica*, n. 3, p.246-247, 2017.

CARNEIRO, J.S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.557-566, 1986.

CARNEIRO, J.S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.17, p.386-394.

CASTELLANI, E.D.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. Colheita de frutos, extração e beneficiamento de sementes de solanáceas arbóreas. **Informativo ABRATES**, v.17, n.1,2,3 p.69-75, 2007.

CASTELLANI, E.D.; DAMIÃO FILHO, C.F.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. Morfologia de frutos e sementes de espécies arbóreas do gênero *Solanum* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.1, p.102-113, 2008.

CHEROBINI, E. A. I.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2008.

COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A.; MACHADO, J. C.; FREITAS-SILVA, O.; PENA, R. C. M.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.3, p.552-555, 2000.

DHINGRA, O.D.; MAIA, C.D.; MESQUITA, J.B. Seedborne pathogenic fungi that affect seedling quality of red angico (*Anadenanthera macrocarpa*) trees in Brazil. **Phytopathology**, v.150, p.451-55, 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15, 1987.

FAVARETTO, R.F.; MUNIZ, M.F.B.; POLETO, T.; KRAHN, J.R.T.; FANTINEL, V.S.; RABUSKE, J.E.; SARZI, J.S. Morphological, physiological and molecular characterization of *Fusarium lacertarum* causal agent of damping-off in *Casuarina equisetifolia*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.13, n.2, p.1-6, 2018.

FERREIRA, F.A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: UFV, SIF, 1989. 570 p.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php&especie=3850. Acesso em 22 ago 2018.

HOLBIG, L.S.; AVELAR, S.A.G; GADOTTI, G.I.; SALINAS, J.C.T.; ZANATTA, G.C.N. Fungos associados a sementes de espécies florestais. In: SCHUCH, L.O.B; VIEIRA, J.F.; RUFINO, C.A.; ABREU JÚNIOR, J.S. **Sementes**: produção, qualidade e inovações tecnológicas. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2013. cap.4, p. 87-118.

KOCH, E.F.A.; FRIGO, P.; MORAES, M. H. D. Inoculação de sementes de fumo bravo (*Solanum granulosoleprosum*) e fedegoso (*Senna alata*) com *Fusarium* sp. sob diferentes períodos de contato. **Informativo Abrates**, v.27, n.2, p.323, 2017.

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

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; 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**, v. 22, n. 3, p. 493-503, 2012.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, R. F. DOS; BLUME, E. First report of *Fusarium equiseti* associated on Pecan (*Carya illinoensis*) seeds in Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.6, p.847-847, 2014.

LISBOA-PADULLA, T.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M.; BARBEDO, C.J. Tratamento de sementes de pau-brasil com fungicidas: efeito na incidência de fungos, germinação e transmissão de fungos pelas sementes. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.148-150, 2009.

LOPES, G.L. Compêndio Digital. Disponível em: <<https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/9452-2/>>. Acesso em 22 ago 2018.

MACHADO, A.A.; MUNIZ, M.F.B.; HOPE, J.M.; CAMARGO, R. Incidência de fungos causadores de “damping off” em caixeta (*Schefflera morototonii* (Aubl.) Dec) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub.) **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.X, 2004. (suplemento).

MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.1, p.3-15.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC-ESAL-FAEPE, 1988, 106p.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: PS/UFLA/FAEPE, 2000, 137p.

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

MACIEL, C. G.; FERRERA, T. S.; BOVOLINI, M. P.; GONZATTO, S.; MUNIZ, M. F. B.; BURIOL, G. A. Transmissão de fungos via semente e patogenicidade de *Pestalotiopsis* sp. em mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, suplemento 1, p. 2767-2774, 2012 a.

MACIEL, C.G., MUNIZ, M.F.B., SANTOS, A.F. DOS., LAZAROTTO, M. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho). **Summa Phytopathologica**, v.38, n.4, p.323-328, 2012 b.

MENTEN, J.O.M.; BUENO, J.T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.7, p.164-191.

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

MUCCI, E.S.M.; LASCA, C.C. Flora fúngica de sementes de essências florestais nativas. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n.2, p. 352-353, 1986.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: Mac Millan Press,1979, v.1, 839 p.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G.; GUEIDAN, C.; CROUS, P.W.; GEISER, D.M. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-equiseti* and *F. chalmydosporum* species complexes within the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.12, p.3851–3861, 2009.

O' DONNELL, K.; HUMBER, R.A.; GEISER, D.M.; KANG, S.; PARK, B.; ROBERT, V.; CROUS, P.W.; JOHNSTON, P.R.; AOKI, T.; ROONEY, A.P.; REHNER, S.A. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and Fusarium MLST. **Mycologia**, v. 104, p.427–445, 2012.

O' DONNELL, K.; WARD, T. J.; ROBERT, V. A. R. G.; CROUS, P.W.; GEISER, D.M.; KANG, S. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions **Phytoparasitica**, v.43, p.583–595, 2015.

PARISI, J.J.D; ANDRADE, F.A.; COUTINHO, E.L.; BOTOSSO, M.C.; MARTINS, M.C. SALES, W.R.M. Qualidade sanitária de sementes e mudas de espécies arbóreas nativas do Estado de São Paulo. **Informativo Abrates**, v.15, n.1,2,3, 2005.

PIVETA, G. **Influência dos métodos de superação da dormência: qualidade fisiológica, sanitária e transmissão de *Alternaria alternata* em sementes de *Lithrea molleoides* e *Senna macranthera***. 2009. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

RAMDIAL, H.; ABREU, K.; RAMPERSAD, S.N. Fungicide sensitivity among isolates of *Colletotrichum truncatum* and *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex infecting bell pepper in Trinidad. **The Plant Pathology Journal**, v.33, n.2, p.118-124, 2017.

REGO, S. S.; SANTOS, A. F.; NOGUEIRA, A. C.; KUNIYOSHI, Y. S. Detection, transmission and pathogenicity of fungi on *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. Seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n.1, p. 009-013, 2012.

RESENDE, M.L.V.; PÁDUA, M.A.; TOYOTA, M. Manejo das Doenças Associadas a Viveiros Florestais. In: DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A. (Ed.). **Produção de Sementes e Mudas de Espécies Florestais**. Lavras: UFLA, 2008. cap.4, p.141-151.

SALES, N.L.P. Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão. 1992. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, A.F.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**, v.30, n.1/2, p.129-138, 2000.

SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S.; SANTANA, D.L.Q. Fungos associados às sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.42, p.51-60, 2001.

SANTOS, A.F.; 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. (Ed. Técnicos). **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. cap.3. p. 37-48.

SOUZA JUNIOR, C.N.; BRANCALION, P.H.S. **Sementes e Mudás**: guia para propagação de árvores brasileiras. São Paulo: Oficina de Textos, 2016. 463p.

THIRUMALAISAMY, P.P.; DUTTA, R.; JADON, K.S.; NATARAJA, M.V.; PADVI, R.D.; RAJYAGURU, R.; YUSUFZAI, S. Association and characterization of the *Fusarium incarnatum*–*F. equiseti* species complex with leaf blight and wilt of peanut in India. **Journal of General Plant Pathology**, p.1-7, 2018.

VECHIATO, M.H.; PARISI, J.J.D. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. **Biológico**, v.75, n.1, 2013.

WALKER, C.; MEZZOMO, R.; MACIEL, C.G.; MUNIZ, M.F.B.; ARAUJO, M.M. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Cordia americana* coletadas na planta e no solo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.10, n.1, p. 259-262, 2015.

WETZEL, M.M.V.S. Fungos do armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S.(Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.cap.9, p.260-275.