

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA FLORESTAL**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE
SEMENTES DE *Cordia americana* (L.)
GOTTSCHLING & J. S. MILL.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Clair Walker

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES
DE *Cordia americana* (L.) GOTTSCHLING &
J. S. MILL.**

Clair Walker

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Proteção Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Florestal.**

Orientadora: Prof^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Walker, Clair

Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cordia americana (l.) gottschling & j. s. mill. / Clair Walker.-2013.

96 p. ; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2013

1. Fusarium verticillioides 2. Fusarium acuminatum 3. Sementes florestais 4. Tombamento de plântulas. I. Muniz, Marlove Fátima Brião II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Florestal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE *Cordia
americana* (L.) GOTTSCHLING & J. S. MILL.**

elaborada por
Clair Walker

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Maristela Machado Araujo, Dr^a. (UFSM)

Igor Poletto, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2013.

*Dedico esse trabalho à minha mãe, Evandina,
pela educação e confiança depositada durante meu caminho.*

“Toda jornada começa sempre com apenas um passo”

Edson Walker

Agradecimentos

A Universidade Federal de Santa Maria, por proporcionar a oportunidade de me qualificar profissionalmente.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, que viabilizou a execução deste trabalho.

A minha orientadora, professora Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação, disponibilidade e auxílio durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Às minhas co-orientadoras, professora Dr^a Lia Reiniger e em especial a Dr^a Maristela Machado Araújo que me acompanhou e orientou durante a graduação, agradeço pela amizade, conhecimentos compartilhados e apoio.

À banca examinadora, Professora Dr^a Maristela Machado Araújo e Dr^o Igor Polleto.

A minha mãe Evandina, pela educação, apoio e confiança depositada em todos esses anos de estudos, pelo exemplo de honestidade e trabalho.

Aos meus irmãos, Altair, Neuza, Jandir e Edson, por estarem sempre ao meu lado prestando ajuda sempre que necessário e pelo exemplo de irmãos que são para mim.

Aos meus avós Regina Oechsler (*in memorian*) e Boniberto Oechsler (*in memorian*), pela educação e ajuda prestada durante toda a trajetória da minha vida.

Aos meus sobrinhos Nicolás, Murilo, Marcos Paulo, André Henrique e Yasmin, pelo carinho e momentos divertidos que sempre passamos juntos.

À minha grande amiga, Aline Ritter Curti, pela amizade de tanto anos e por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegria e dificuldades, pela ajuda e dicas neste trabalho.

Às minhas amigas, Janine Barcellos e Paula Mazutti, pela convivência e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, em especial a Maria Neves Weber, pela orientação nos trabalhos, apoio nos momentos difíceis da vida, amizade e alegria transmitida no dia a dia do laboratório. Agradeço também ao Fernando Cognato, pela assistência técnica em meu computador, ajuda no laboratório e amizade.

À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Tita, pela amizade e disponibilidade.

Aos queridos colegas de laboratório, Caciara Gonzatto, Paola Milanesi, Marília Lazarotto e Ricardo Mezzomo, que nunca mediram esforços para me ajudar nos trabalhos, pelo conhecimento transmitido, pela amizade e bons momentos juntos.

Às colegas de laboratório que também prestaram ajuda durante o desenvolvimento do trabalho à campo e no laboratório: Camila Pollet, Carisiane Jaroczewki, Marciéli Bovolini, Danieli Brum e Jucéli Müller.

Ao colega Evandro Missio, pelo apoio nos trabalhos realizados na Fepagro.

Aos demais colegas do laboratório de Fitopatologia: Patrícia Migliorini, Cláudia Dutra, Geísa Finger, Graziela Piveta, Gisele Noal, Ricardo dos Santos, Emanuele Junges, Leíse Hekcler, Tales Poletto, Bruna Bastos, Gerarda Beatriz, Marciele Barbieri, Johnathan Rodrigues, pelo convívio e amizade.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com meu trabalho e estiveram presentes em algum momento dessa trajetória.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE *Cordia americana* (L.) GOTTSCHLING & J. S. MILL.

AUTORA: CLAIR WALKER
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
SANTA MARIA, 22 DE FEVEREIRO DE 2013.

Cordia americana (L.) Gottschling & J. S. Mill. (guajuvira) é uma espécie florestal amplamente distribuída no território brasileiro e que apresenta importância econômica e ambiental. Portanto, existe uma grande demanda por pesquisas na área de tecnologia de sementes para essa espécie, quanto à qualidade fisiológica e sanitária de suas sementes e, principalmente pela associação de *Fusarium* spp. Os objetivos do presente trabalho consistiram em determinar o ponto de maturação fisiológica e o sistema de coleta de sementes mais favorável à qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *C. americana*, além de avaliar a patogenicidade de *Fusarium* sp. associado a sementes, caracterizando de forma morfológica e molecular o patógeno em nível de espécie. A fenologia da espécie foi acompanhada durante os estágios de desenvolvimento e, após o início da maturação dos frutos, foram realizadas coletas desses diretamente na planta e no solo. Após as coletas, foi determinado o teor de umidade das sementes, o período de máximo acúmulo de matéria seca, máxima germinação e vigor, além de avaliações da qualidade sanitária. Através dos testes de transmissão, foi verificada a ocorrência de *Fusarium* spp., causando sintomas de doença nas plântulas. Foram obtidos quatro isolados do fungo que foram inoculados nas sementes para provar a sua patogenicidade. A caracterização morfológica foi realizada através de uma chave de identificação para o gênero *Fusarium* e, para a identificação molecular, foram sequenciadas as regiões genômicas ITS e fator de alongação 1- α . Os resultados obtidos permitem inferir que o ponto de maturidade fisiológica nas sementes de *C. americana* ocorre aos 52 dias após antese e que as espécies *F. acuminatum* e *F. verticillioides* foram patogênicas a espécie, causando tombamento em pré e pós-emergência.

Palavras-chave: *Fusarium verticillioides*. *Fusarium acuminatum*. Sementes florestais. Tombamento de plântulas.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Professional Graduation Program in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

PHYSIOLOGICAL AND SANITARY QUALITY OF SEEDS IN *Cordia americana* (L.) GOTTSCHLING & J.S.MILL. SEEDS.

AUTHOR: CLAIR WALKER
ADVISER: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
Defense place and date: Santa Maria, February 22nd, 2013.

Cordia americana (L.) Gottschling & J.S.Mill. (guajuvira) is a forest species widely distributed in Brazil with importance in its economics and environment. Therefore, there is a great demand of research in seed technology for this species, as for the physiological and sanitary quality of seeds and, mainly, for the association of *Fusarium* spp. The objectives of this study were to determine the physiological maturity and seed collecting system to be more favorable to sanitary and physiological quality of the *C. americana* seeds and evaluate the pathogenicity of *Fusarium* sp. associated with them, morphological and molecularly characterizing the pathogen on the species level. The phenology of this species was closely observed during the development stages and, after the maturation onset of its fruits, they were collected in the plant and its soil. After the picking, it was determined the moisture content of the seeds, the period of maximum dry weight mass accumulation, maximum germination and vigor, besides, sanitary quality ratings. Through the transmission tests, it was found to occur *Fusarium* spp. causing disease symptoms in seedlings. After obtaining four isolates of the fungus, they were inoculated in seeds to prove its pathogenicity. The morphological characterization was performed using an identification key for the genus *Fusarium* and, for the molecular identification, genomic regions ITS were sequenced with its elongation factor 1- α . The results may conclude that physiological maturation in *C. americana* seeds occurs at 52 days after anthesis and the species *F. acuminatum* and *F. verticillioides* were pathogenic to species, causing damping-off in pre and post emergence.

Keywords: Forest seeds. *Fusarium* spp.. Seeds sanity. Damping-off.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Imagem da área de localização das árvores matrizes de *Cordia americana* na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), do Google Earth34
- Figura 2 - Teor de água das sementes de *Cordia americana* coletadas no solo..45
- Figura 3 - Acúmulo de massa seca de sementes de *Cordia americana* coletadas no solo46
- Figura 4 - Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) de sementes de *Cordia americana* coletadas no solo.....49
- Figura 5 - Sintomas observados em plântulas no teste de patogenicidade. Tombamento em pré-emergência de plântula (A e C); tombamento em pós-emergência (B) apodrecimento de raiz (D e E), lesão e posterior ruptura do hipocótilo (D); micélio de *Fusarium* sp. nos cotilédones e raiz (F e G).66
- Figura 6 - Características das culturas de *Fusarium acuminatum* em meio BDA. Vista superior na placa de Petri (A); vista inferior na placa de Petri (B); vista superior no tubo de ensaio (C); vista inferior no tubo de ensaio (D).....72
- Figura 7 - Características morfológicas da cultura de *Fusarium acuminatum* em meio folha-de-cravo (CLA) vista em microscópio óptico com aumento de 40 x. Esporodóquio (A); medida microscópica de macroconídio (B); clamidósporos (C); conidióforo em monofialide (D).73
- Figura 8 - Análise de regressão para diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial de *Fusarium acuminatum* em meio BDA, incubado a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.74
- Figura 9 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).....76
- Figura 10 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α . Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).78
- Figura 11 - Características da cultura de *Fusarium verticillioides* em meio BDA. Vista superior na placa de Petri (A); vista inferior na placa de Petri (B); vista superior no tubo de ensaio (C); vista inferior no tubo de ensaio (D).....80

- Figura 12 - Características morfológicas da cultura de *Fusarium verticillioides* em meio folha-de-cravo (CLA) vista em microscópio óptico com aumento de 40 x. Esporodóquio (A); medida microscópica de macroconídio (B); conidióforo em monofiálide (C); Microconídios em cadeias (D).81
- Figura 13 - Análise de regressão para diâmetro da colônia (DC) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Fusarium verticillioides* em meio BDA, incubado a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.82
- Figura 14 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).84
- Figura 15 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α . Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).86

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios de teor de água (%), massa fresca e seca de sementes de *Cordia americana* obtidos pelo método de coleta do solo e planta do primeiro período de coleta (PC1) e segundo período de coleta (PC2).41
- Tabela 2 - Valores médios de condutividade elétrica (CE) de sementes, primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas (SNG) de *Cordia americana* obtidos do primeiro período de coleta (PC1) e segundo período de coleta (PC2).42
- Tabela 3 - Valores médios de condutividade elétrica (CE) de sementes, primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais, anormais e sementes não germinadas (SNG) de *Cordia americana* obtidos pelo método de coleta do solo e planta do primeiro (PC1) e segundo período de coleta (PC2).43
- Tabela 4 - Incidência de fungos (%) associados às sementes de *Cordia americana*, detectados pelo teste em papel-filtro, obtidos no primeiro (PC1) e segundo período de coleta (PC2) através dos métodos de coleta do solo e planta.44
- Tabela 17 - Acesso no Genbank, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Descrição da espécie – Guajuvira (<i>Cordia americana</i> (L.) Gottschling & J.S.Mill.).....	16
2.2 Fenologia do florescimento e frutificação e coleta de sementes florestais.....	17
2.3 Análise de sementes.....	21
2.4.1 Qualidade física das sementes.....	22
2.4.1.1 Teor de água e massa seca.....	22
2.4.2 Qualidade fisiológica de sementes.....	23
2.4.2.1 Teste de germinação.....	23
2.4.2.2 Testes de vigor.....	24
2.4.2.2.1 Condutividade elétrica.....	25
2.4.3 Qualidade sanitária das sementes.....	26
2.4.3.1 <i>Fusarium</i> sp.	29
CAPÍTULO I.....	31
MATURAÇÃO FISIOLÓGICA E MÉTODOS DE COLETA DE SEMENTES DE <i>Cordia americana</i> (L.) GOTTSCHLING & J.S.MILL.) E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA.....	31
3 INTRODUÇÃO.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Caracterização da área de estudo.....	34
4.2 Acompanhamento dos eventos fenológicos.....	35
4.3 Coleta e beneficiamento dos frutos.....	35
4.4 Análise de sementes.....	36
4.4.1 Qualidade física das sementes.....	36
4.4.1.1 Teor de água e massa seca.....	36
4.4.2 Qualidade fisiológica das sementes.....	36
4.4.2.1 Teste de germinação e primeira contagem.....	36
4.4.2.2 Condutividade elétrica.....	37
4.4.3 Qualidade sanitária das sementes.....	37
4.5 Procedimento estatístico.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
5.1 Acompanhamento dos eventos fenológicos.....	39

5.2 Coleta dos frutos	39
5.3 Análise de sementes coletadas no primeiro (PC1) e segundo período de coleta (PC2) através dos métodos de coleta Solo X Planta	40
5.3.1 Teor de água, massa fresca e seca.....	40
5.3.2 Qualidade fisiológica de sementes	42
5.3.3 Qualidade sanitária das sementes.....	44
5.4 Análise de sementes coletadas no solo	45
5.4.1 Teor de água	45
5.4.2 Massa seca.....	46
5.4.3 Germinação e vigor.....	47
5.4.3.1 Condutividade elétrica	48
5.4.4 Qualidade sanitária.....	49
6 CONCLUSÕES	52
CAPÍTULO II	53
7 INTRODUÇÃO	55
8 MATERIAL E MÉTODOS	56
8.1 Teste de transmissão de fungos via sementes	56
8.2 Isolamento dos fungos	56
8.3 Patogenicidade de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de <i>Cordia americana</i>	57
8.3 Caracterização morfológica dos isolados	59
8.3.1 Crescimento micelial.....	59
8.3.2 Coloração da colônia fúngica.....	60
8.3.3 Análise das estruturas reprodutivas em meio de cultura folha de cravo (CLA)	60
8.4 Caracterização Molecular dos Isolados	61
8.5 Procedimento estatístico	62
9 RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
9.2 Índice de velocidade de emergência (IVE)	67
9.3 Massa verde e comprimento de plântulas	68
9.4 Caracterização dos isolados	70
9.4.1 <i>Fusarium acuminatum</i> Ellis & Everhart	70
9.4.1.1 Caracterização morfológica	70
9.4.1.2 Caracterização molecular	74
9.4.2 <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg (G) (Syn: <i>F. moniliforme</i>)	78
9.4.2.1 Caracterização morfológica	78

9.4.2.2 Caracterização molecular	82
10 CONCLUSÕES	87
11 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

'1 INTRODUÇÃO GERAL

A biodiversidade brasileira é reconhecida como uma das mais ricas do mundo, com um número de espécies estimado em 20% de toda a biodiversidade existente (DAVIDE; SILVA, 2008). Nas últimas décadas, tem sido visível a necessidade de conservação e recuperação da biodiversidade para não comprometer a sobrevivência das futuras gerações. Todavia, além do grande número de espécies florestais nativas, ocorre uma falta de informações técnicas sobre produção de sementes e mudas, o que tem ocasionado um déficit na demanda de sementes dessas espécies para serem utilizadas em projetos de conservação e reflorestamento. Enquanto que na produção de mudas de eucalipto as sementes disponíveis para compra são de melhor qualidade, na produção de mudas nativas existe certa dificuldade. De acordo com Macedo et al. (2004), existe pouca disponibilidade de sementes nativas de boa qualidade no mercado, sendo que o principal problema é a dificuldade de coleta de sementes na floresta nativa.

Atualmente, são discutidos os problemas e os avanços da pesquisa em sementes em relação às diversas fases que antecedem a semeadura de espécies florestais, bem como os métodos atualmente empregados na coleta de sementes. Devido à grande diversidade de espécies, torna-se necessário adaptar ou criar métodos tecnológicos adequados para cada espécie para se obter melhorias no padrão de qualidade das sementes.

O intercâmbio de sementes florestais nativas entre regiões tem sido intensificado nos últimos anos, o que tem ocasionado uma movimentação inevitável de patógenos, constituindo-se, em um dos principais meios de disseminação desses microorganismos em plantas. Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), as sementes podem carregar, na sua superfície ou internamente, fungos e outros organismos.

Neste contexto, deve-se destacar a *Cordia americana* (L.) Gottschling & J. S. Mill. (guajuvira), espécie florestal com ampla distribuição natural no território brasileiro, desempenhando papel importante em reflorestamentos e, utilizada em arborização, além de ser indicada na construção civil, carpintaria e também por apresentar lenha de boa qualidade (CARVALHO, 2003).

O fungo *Fusarium* spp. é amplamente distribuído ao redor do mundo e tem sido muito estudado na área agrícola em diversas espécies de importância econômica, sendo esse patógeno associado às sementes, causando inúmeras doenças. No Brasil, há uma carência de pesquisas voltadas ao estudo da influência desse patógeno na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais.

Para a produção de mudas de qualidade, torna-se necessário conhecer a qualidade fisiológica e sanitária das sementes utilizadas. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo geral acompanhar a maturação fisiológica e o método de coleta de sementes mais favorável à qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *C. americana* e, avaliar a patogenicidade de *Fusarium* sp. associado a sementes, caracterizando de forma morfológica e molecular o patógeno em nível de espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição da espécie – Guajuvira (*Cordia americana* (L.) Gottschling & J. S. Mill.)

A espécie *Cordia americana* (L.) Gottschling & J. S. Mill. pertence à família Boraginaceae, conhecida popularmente como guajuvira, guajuvira-branca, guaiuvira, Schwarz Herz (Schwarz Herz = cerne-negro: nome dado pelos colonos teuto-brasileiros) entre outros (REITZ et al., 1988). Espécie arbórea de 10 a 25 m de altura, diâmetro de 20 a 40 cm, podendo atingir na idade adulta até 30 m de altura e diâmetro de 100 cm (CARVALHO, 2003).

No Brasil, *Cordia americana* ocorre naturalmente desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, sendo que se distribui também no leste do Paraguai, Argentina e Uruguai. No Rio Grande do Sul, a espécie é frequente e abundante nas florestas do Alto Uruguai, em toda Depressão Central e na parte leste do Escudo Rio-grandense (REITZ et al., 1988).

Cordia americana tem comportamento dentro do grupo sucessional como espécie pioneira (LORENZI, 2008), apresenta distribuição irregular na floresta em virtude de preferir solos úmidos, é pouco frequente ou mesmo rara nas encostas íngremes ou rochosas e terrenos secos, possui intensa agressividade invadindo roças e capoeiras (REITZ et al., 1988), considerada uma das espécies pioneiras mais típicas de áreas abandonadas do oeste catarinense (LORENZI, 2008).

A madeira de *Cordia americana* é moderadamente pesada ($0,78 \text{ g cm}^{-3}$), dura, resistente, muito durável mesmo submersa na água ou enterrada, cerne podendo apresentar coloração escura (LORENZI, 2008). De acordo com Carvalho (2003), a madeira de *C. americana* é indicada para construção civil (vigas, caibros, ripas, batentes de portas e janelas, tacos e tábuas para assoalho) em obras externas (postes, mourões, estacas), cabos de ferramentas, dentre outras utilizações. Segundo Lorenzi (2008), foi muito utilizada pelos índios para a construção de arcos devido a sua boa elasticidade e flexibilidade. Além disso, a espécie é utilizada no paisagismo em geral e recomendada para reflorestamentos.

A floração da espécie ocorre em setembro, outubro e novembro (Rio Grande do Sul), sendo que a maturação dos frutos e sementes é nos meses de novembro, dezembro e janeiro (REITZ et al., 1988). As flores são hermafroditas, coloração branca ou bege, com 5 mm de comprimento, perfumadas, reunidas em panículas terminais, sendo que a polinização é realizada principalmente por abelhas e diversos insetos pequenos, enquanto que a dispersão dos frutos e sementes ocorre principalmente por via anemocórica e também autocórica (CARVALHO, 2003).

O fruto de *Cordia americana* possui um formato semelhante a uma hélice, facilitando, dessa maneira, a disseminação pelo vento, sendo classificado como drupa subglobosa, com ápice agudo formado pela base persistente do estilete, com 4 a 6 mm de comprimento, acompanhado sempre do cálice. As sementes possuem coloração marrom-escura, de forma globosa, com até 3 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento, apresentando um prolongamento pontudo no ápice (CARVALHO, 2003).

2.2 Fenologia do florescimento e frutificação e coleta de sementes florestais

A recuperação de áreas alteradas devido às pressões antrópicas sobre os recursos naturais envolve ações de revegetação com o uso de espécies nativas. Entretanto, para efetuar essa recuperação há a necessidade da disponibilidade de sementes de qualidade, tanto em diversidade de espécies quanto em diversidade genética (NETO; SILVA, 2007).

A preocupação com a produção de sementes de espécies florestais nativas intensificou-se a partir dos anos 80, com o aumento da conscientização ambiental. Nas décadas de 50 a 80, não havia igual demanda por espécies florestais nativas e mesmo para algumas exóticas (PIÑA-RODRIGUES et al., 2007). De acordo com Silva e Higa (2006) existe uma grande demanda por sementes de espécies florestais nativas para atender programas dos governos federais e estaduais, preocupados com o estabelecimento de plantios com espécies nativas, além de processos de restauração de matas ciliares e reservas legais.

A fenologia é uma ciência que estuda os fenômenos de floração, frutificação, brotamento e queda de folhas, a fim de conhecer o ciclo anual das espécies em estudo, sendo que essas fases estão relacionadas às condições climáticas e à adaptação de cada espécie em sua área de dispersão (ANDREIS et al., 2005). Os mesmos autores relatam que esses estudos fenológicos de populações florestais na Região Sul do Brasil foram importantes no sentido de trazer informações para programas de recuperação florestal, ou qualquer outro programa que utiliza sementes de espécies florestais nativas, pois indicam, por exemplo, o período de coleta de sementes.

A pesquisa em maturação de sementes está ligada ao reconhecimento dos padrões de produção de sementes e os índices de maturação que podem ser empregados para sua avaliação (PIÑA-RODRIGUES et al., 2007). De acordo com os autores, a colheita de sementes em época adequada é um fator relevante na qualidade das sementes, sendo que a determinação de índices de maturação ainda é realizada com base em conhecimentos empíricos (alteração de coloração, abertura dos frutos entre outros). Porém, existem poucas pesquisas objetivando o desenvolvimento de índices que determinam a máxima capacidade germinativa e vigor.

Marcos Filho (2005) ressalta a importância de informações básicas que determinam a maturidade fisiológica e a época mais adequada para a colheita de espécies de importância econômica, pois quando esta é efetuada em momento inadequado, ocasiona prejuízos na qualidade, além de provocar perdas quantitativas. A permanência das sementes no campo presas na planta mãe, por períodos prolongados, contribui para o decréscimo do potencial fisiológico, acelerando a deterioração das sementes.

Segundo levantamentos realizados por Piña-Rodrigues et al. (2007), os pesquisadores concluíram que os temas maturação, patologia, fenologia e colheita foram os que apresentaram menor percentual de estudo ou referências. Verificou-se que apenas 1,3% das pesquisas realizadas com sementes florestais enfocaram o processo de maturação. Dentre as espécies estudadas destacam-se: *Clarisia racemosa*, *Cedrela fissilis*, *Plantaifera langsdorffii*, *Inga uruguensis*, *Pterygota brasiliensis*, *Tabebuia avellanadae* e *Trema micrantha*.

Os frutos e sementes, durante o processo de maturação, passam por modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas e, esses parâmetros são

utilizados para a determinação do ponto de maturidade e a definição de seus índices práticos (PIÑA-RODRIGUES; AGUIAR, 1993). O ponto de maturidade fisiológica, de acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), é entendido como o ponto em que a semente apresenta a máxima germinação e vigor.

Durante a coleta é importante que os coletores de sementes conheçam a fenologia, a forma de dispersão e o ponto de maturidade fisiológica das sementes, que é muitas vezes determinada pela coloração, teor de umidade, densidade, tamanho e peso dos frutos e sementes (FIGLIOLIA et al., 1993).

A velocidade de maturação depende da espécie e das condições climáticas, variando entre indivíduos e ao longo dos anos, bem como entre locais de coleta de sementes (FIGLIOLIA, 1995). A semente durante o seu desenvolvimento aumenta de peso, tanto em matéria verde como em matéria seca, até atingir o seu máximo. A maneira mais eficiente de determinar o ponto de maturação é realizar colheita periódica de sementes desde o início da maturação dos frutos até a queda dos mesmos e fazer testes de germinação. Quando os testes apresentarem maior índice de germinação, este é o ponto máximo de acúmulo de matéria seca (OLIVEIRA, 2007). Em um trabalho de maturação fisiológica de sementes de *Eugenia uniflora* L. Ávila et al. (2009) verificaram que o momento adequado para a coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. ocorreu entre 56 e 63 dias após a antese, sendo alcançada quando a altura, diâmetro e peso de frutos e sementes atingiram seus valores máximos e quando o teor de água e massa seca das sementes tenderam à estabilização. Resultados semelhantes em um estudo de maturação fisiológica com sementes de *Erythrina crista-galli* L. foram encontrados por Lazarotto et al. (2011).

Durante a fase de desenvolvimento das sementes ocorrem mudanças fisiológicas que, segundo Davide e Silva (2008), podem ser divididas em três estágios: fase de formação do embrião (intensa divisão celular e onde os cotilédones são formados), fase de maturação do embrião (aumento do peso seco) e fase da dessecação (queda acentuada do conteúdo de água).

A coleta é recomendada, de acordo com Davide e Silva (2008), quando as sementes atingirem o ponto de maturidade fisiológica, com o máximo acúmulo de matéria seca e máxima germinação, onde normalmente ocorre a dispersão das sementes.

Dentre os métodos de coleta de sementes, Piña-Rodrigues (2002), cita a coleta direta no solo e na planta das árvores. A colheita direta do solo é utilizada em

árvores baixas, de copa densa, onde é possível usar podões e escadas. Este método também é utilizado para espécies que não lançam suas sementes muito longe da planta, assim, estende-se uma lona abaixo dessas árvores e aguarda-se a queda dos frutos. A colheita na copa das árvores é um método mais difícil, em função da altura das árvores, isso requer maior habilidade de quem executa a colheita. Para realização deste método, usam-se escadas flexíveis, escadas acopladas, esporas bloqueando ao tronco e alpinismo.

De acordo com as recomendações de Lorenzi (2008) a colheita dos frutos de *Cordia americana* deve ser realizada diretamente da árvore, quando os mesmos iniciarem a queda espontânea, estendendo-se uma lona sob a árvore e em seguida devem-se balançar os ramos. Para Carvalho (2003) as sementes devem ser colhidas na transição da cor amarelada para marrom-claro.

Em um estudo de observações fenológicas realizado no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria-RS, no período de agosto de 2010 a agosto de 2011, tendo como foco nove indivíduos de *Cordia americana*, Ferrera (2012) observou que as fenofases de botão floral e antese ocorreram nos meses de setembro a novembro, enquanto que os frutos imaturos/verdes e maduros no mês de dezembro.

Segundo Piña-Rodrigues (2002), após a colheita devem-se ter alguns cuidados com os frutos e sementes para garantir a boa qualidade do produto final. Os frutos ou sementes coletados devem ser separados dos ramos e outras impurezas, levados ao local de beneficiamento em embalagens apropriadas e bem arejadas. No local de beneficiamento, devem ser espalhados de forma que não entrem em contato com o solo, a partir daí realiza-se o processo de acordo com o tipo de fruto.

Piña-Rodrigues (2002) recomenda que o armazenamento das sementes deva ser em embalagens que diminuem a absorção de umidade, como sacos de plásticos, pano ou papel e armazenadas em câmara fria, seca, câmara fria e seca ou ainda em refrigeradores.

A emergência das sementes de *Cordia americana* ocorre em 15-20 dias (REITZ et al., 1988; CARVALHO, 2003) e a taxa de germinação é em média 80% podendo chegar a 100% (CARVALHO, 2003).

2.3 Análise de sementes

A análise de sementes é feita com o objetivo de conhecer as qualidades físicas, fisiológicas e sanitárias dos lotes para fins de semeadura e armazenamento. No Brasil, a metodologia é baseada nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), porém para as espécies florestais nativas, poucas informações são descritas, pois a aplicação é principalmente para as espécies agrícolas. No entanto, em agosto de 2011, durante o VI Simpósio Brasileiro de Sementes Florestais e XVII Congresso Brasileiro de Sementes, em Natal-RN, foi lançado o Manual de Procedimentos para a Análise de Sementes Florestais (LIMA JUNIOR, 2010), ainda em fase de organização, com a finalidade de contribuir com informações para as espécies florestais nativas.

Figliolia et al. (2007) relatam que existe uma grande dificuldade em se trabalhar com espécies florestais utilizando-se a RAS, em função de que a maioria das normas e prescrições utilizadas na análise de sementes de essências florestais são baseadas e/ou adaptadas das prescrições estabelecidas para as espécies agrícolas. Apenas 0,2% das espécies florestais brasileiras estão contidas nas RAS, sendo esse percentual considerado inexpressivo diante da grande diversidade de espécies brasileiras. Dessa maneira, compromete-se o fornecimento de dados corretos aos viveiristas, uma vez que os procedimentos adequados para a análise de sementes florestais não foram adotados. No entanto, por meio da Instrução Normativa nº 26 de 10 de setembro de 2012, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram validados métodos oficiais para análises de 25 espécies de sementes florestais. Essas validações oferecem aos laboratórios de análise metodologias oficiais que possibilitam o comércio legal de sementes no Brasil. Até o momento, já foram validados e oficializados métodos para 50 espécies florestais desde a publicação da primeira normatização (IN nº 44, de 23 de dezembro de 2010), regida pela Lei 10.711/2003, que instituiu o Sistema Nacional de Sementes e Mudas, regulamentado pelo Decreto 5.153/2004.

2.4.1 Qualidade física das sementes

A análise física das sementes através da determinação do teor de água e massa seca permite uma análise rápida das sementes. Estas informações podem auxiliar na identificação de problemas na qualidade física e que refletem nos resultados de germinação das mesmas.

2.4.1.1 Teor de água e massa seca

Através da informação do teor de água da semente, é possível fazer um manejo adequado para a manutenção da viabilidade, quando se trabalha com aquelas que requerem baixo grau de umidade durante o armazenamento (grupo das sementes ortodoxas). Para as sementes recalcitrantes essa verificação também é essencial, principalmente durante a secagem, pois abaixo do teor de água de segurança a viabilidade é afetada negativamente (LIMA JUNIOR, 2010).

O teor de água é uma das principais alterações no processo de desenvolvimento do óvulo. Após a fecundação, o óvulo apresenta valores altos de umidade, decrescendo durante o processo de maturação. Enquanto as sementes acumulam reservas, a desidratação é lenta, acelerando a partir da época em que as mesmas atingem a máxima massa de matéria seca. A partir desse momento, as sementes são desconectadas do sistema vascular da planta (MARCOS FILHO, 2005). Dessa maneira, o acompanhamento do teor de água durante a maturação é importante para a tomada de decisão para o início da colheita de sementes.

A determinação do teor de água baseia-se na retirada da água contida nas sementes, em forma de vapor, pela aplicação do calor em condições controladas (BRASIL, 2009). Para as sementes florestais, o método de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas foi adotado oficialmente como método padrão no Brasil (LIMA JUNIOR, 2010).

O acúmulo de matéria seca na semente, no início de sua formação ocorre de maneira lenta, e em curto período, porém, nesse período, o acúmulo de matéria seca se dá de maneira mais rápida e de forma constante até atingir máximo acúmulo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Os mesmos autores ressaltam que o peso de

matéria seca é uma característica que indica o melhor índice do estágio de maturação de sementes, porém não deve ser utilizada como único indicador.

De acordo com diversas pesquisas, o acompanhamento da massa seca das sementes é realizado em intervalos variáveis durante a maturação. Após a coleta de sementes, o procedimento mais frequente é a secagem das mesmas em estufa, e a pesagem das mesmas quando secas (MARCOS FILHO, 2005). No entanto, o autor relata que existe certa dificuldade para a obtenção de resultados precisos, uma vez que nas etapas finais da maturação, a detecção dos acréscimos no peso de sementes é cada vez menos acentuada e difícil de ser detectada com o uso de equipamentos (estufas, balanças) com alta sensibilidade, podendo gerar resultados imprecisos.

2.4.2 Qualidade fisiológica de sementes

A qualidade fisiológica das sementes pode ser avaliada através de testes de germinação e vigor, os quais são realizados com o objetivo de separar lotes de sementes com qualidades diferentes e, além disso, fazer uma previsão do potencial de máxima germinação e vigor das sementes.

2.4.2.1 Teste de germinação

O processo de germinação inicia com a embebição de água pela semente e termina com a protrusão da radícula pelo endosperma ou tegumento (DAVIDE; SILVA, 2008). No entanto, para os viveiristas e produtores rurais, os autores definem germinação como o momento da emergência da plântula no solo, onde é visualizada a emissão das primeiras folhas.

De acordo com a RAS (BRASIL, 2009) e Manual de Procedimentos para a Análise de Sementes Florestais (LIMA JUNIOR, 2010), germinação é a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do sistema radicular (raízes primária, secundárias e, em alguns gêneros, raízes seminais) e da parte aérea (hipocótilo

e/ou epicótilo, cotilédones, primeiras folhas e gema terminal), demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo.

As sementes podem germinar poucos dias após a fecundação do óvulo, no entanto, essa afirmação se refere à protrusão de raiz primária e não à formação de plântulas normais. Durante a fase de maturação, a porcentagem de germinação é crescente, atingindo o seu máximo em época próxima à da paralisação do fluxo da matéria seca da planta para a semente (MARCOS FILHO, 2005).

O teste de germinação consiste em determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, podendo ser utilizado para comparar a qualidade de diferentes lotes para fins de semeadura e produção de mudas (BRASIL, 2009). As condições e limites de tempo são estabelecidos pela RAS e no Manual de Procedimentos para a Análise de Sementes Florestais. Essas condições são relacionadas à disponibilidade de água e aeração, temperatura, luminosidade, tipos de substrato, de outros materiais e equipamentos, objetivando garantir a eficiência do processo de germinação (MARCOS FILHO, 2005).

O resultado dos testes de germinação no laboratório deve refletir o potencial máximo de germinação de um lote de sementes sob condições ambientais ideais. Dessa maneira, o resultado expressa apenas uma previsão da emergência no viveiro, superestimando o resultado da germinação no laboratório (LIMA JUNIOR, 2010).

2.4.2.2 Testes de vigor

O vigor é caracterizado como o nível de energia de que uma semente dispõe para realizar as tarefas do processo germinativo, sendo considerado a rapidez e a uniformidade de germinação, além da perfeição da plântula produzida (OLIVEIRA, 2007). Durante a maturação de sementes, o vigor se comporta de maneira semelhante à germinação, atingindo o máximo de sementes vigorosas em época muito próxima com o máximo acúmulo de reservas (MARCOS FILHO, 2005).

A avaliação do vigor fornece informações adicionais às proporcionadas pelo teste de germinação, pois procura detectar diferenças significativas no potencial

fisiológico de lotes com germinação semelhante. Os resultados dos testes permitem distinguir lotes de sementes de alto e de baixo vigor (MARCOS FILHO, 2005).

Na análise padrão de germinação é possível avaliar o vigor através de testes de velocidade de desenvolvimento. Os mais utilizados são o tempo médio de germinação, o índice de velocidade de germinação, a primeira contagem do teste de germinação e a análise de plântulas (PINÃ-RODRIGUES et al., 2004). O teste que avalia a velocidade de germinação possui uma relação direta com o vigor das sementes, pois baseia-se no pressuposto de que sementes mais vigorosas germinarão mais rapidamente do que outras em condições inferiores. Assim, lotes com desempenho germinativo semelhante podem diferir quanto à velocidade de germinação e, assim, indicando que existem diferenças de vigor entre eles (VIEIRA; CARVALHO, 1994). No teste de primeira contagem, também é possível avaliar indiretamente a velocidade de germinação, uma vez que, quanto maior o número de plântulas normais computadas na data da primeira contagem, maior será o vigor do lote (NAKAGAWA, 1999).

Além dos testes de velocidade de desenvolvimento, a análise de plântulas também é considerada um teste de vigor, fornecendo dados adicionais que enriquecem o teste de germinação, permitindo distinguir graus variados de vigor. A avaliação é realizada através de medições das estruturas (radícula, epicótilo, cotilédones) das plântulas normais, além disso, é possível obter o peso seco das mesmas através da secagem em estufa (PINÃ-RODRIGUES et al., 2004).

2.4.2.2.1 Condutividade elétrica

O teste da condutividade elétrica é considerado, segundo a International Seed Testing Association (ISTA) e a Association of Official Seed Analysts (AOSA), um dos mais importantes para estimar o vigor de sementes. Este teste possui base teórica consistente, objetividade, rapidez, facilidade de execução e possibilidade de ser padronizado como teste de rotina por causa de sua reprodutibilidade (VIEIRA et al., 1994).

A condutividade elétrica é um teste bioquímico, baseado na integridade das membranas celulares. O princípio do teste baseia-se no fato de que sementes

menos vigorosas (ou mais deterioradas) apresentam perda da integridade das membranas e, conseqüentemente aumenta a quantidade de eletrólitos lixiviados para o meio exterior. Dessa maneira, a avaliação do teste é realizada, comparando-se os valores das leituras da liberação de solutos durante a embebição de diferentes amostras. O resultado indica possíveis diferenças de vigor, sendo que as menos vigorosas apresentam sistema de membranas mais desorganizado e originam valores mais altos de condutividade elétrica (MARCOS FILHO, 2005).

O teste de condutividade elétrica pode ser realizado de forma massal ou individual nas sementes. Através do método massal é possível analisar uma amostra de sementes sendo fornecido como resultado a média de condutividade da solução, no entanto, se uma semente da amostra apresentar problema, o resultado de toda amostra está comprometido. No método individual, o princípio do teste é o mesmo do massal, porém a quantificação dos lixiviados é feita em cada semente.

Marques et al. (2002) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar o efeito do número de sementes e do volume de água utilizada no teste de condutividade elétrica para avaliar o vigor de três lotes de sementes de *Dalbergia nigra* (jacarandá-da-bahia). De acordo com os resultados, os autores sugerem que o teste se mostrou eficiente na diferenciação de lotes, apresentando alta associação com a germinação, em condições de laboratório e viveiro. Para as espécies florestais, este teste apresenta dificuldades devido à necessidade de padronizar o volume de água no qual as sementes serão imersas, pois muitas têm tamanho grande e a quantidade de água adicionada não é suficiente para manter as sementes sob imersão.

2.4.3 Qualidade sanitária das sementes

A qualidade das sementes pode ser afetada por diversos fatores, dentre eles a associação de microrganismos, que constitui uma preocupação crescente. Dentre esses microrganismos, os fungos formam o maior grupo de agentes patogênicos, seguido das bactérias e, em menor proporção, dos vírus e dos nematóides (MACHADO, 2000).

A associação de microrganismos em sementes pode ocorrer durante o processo de maturação, causando prejuízos durante a germinação. A ocorrência de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, dentre outros, conhecidos como “fungos de campo”, é aumentada durante o período prolongado de permanência no campo após a maturidade, onde são expostas a condições de ambiente úmido e quente (MARCOS FILHO, 2005).

Marcos Filho (2005) recomenda atenção durante o manejo das sementes pós-maturidade, a partir da colheita, pois as práticas de controle curativo não têm demonstrado eficiência. Além disso, a secagem, beneficiamento adequado e armazenamento em ambiente com umidade relativa inferior a 65%, auxiliam na redução do problema.

Os patógenos apresentam diferentes formas de estar veiculados em um lote de sementes, sendo importante conhecer a dinâmica de transmissão desses microrganismos (MACHADO, 2000). O transporte de patógenos por sementes pode ser efetuado através das impurezas presentes no lote, aderido à superfície das sementes ou então, o inóculo pode estar no interior das sementes, seja nas camadas externas ou no embrião (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Os “fungos de armazenamento”, dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces* se desenvolvem mais rapidamente nas sementes quando a umidade relativa do ar situa-se acima de 80% e o teor de água é superior a 14%. No início da deterioração, atuam os fungos *Aspergillus restrictus* e *A. glaucus* e, no final da deterioração quando as sementes estão praticamente exauridas, predominam *A. flavus* e *Penicillium* spp. (MARCOS FILHO, 2005).

Os métodos de detecção mais comumente utilizados para identificar fungos em sementes são o método do papel-filtro ou “blotter test” e métodos que utilizam meios de cultura. Os meios de cultura podem ser muito variados, mas necessitam de uma fonte de carbono e nitrogênio, além de outros elementos em menor quantidade, tais como potássio, fósforo, enxofre, ferro, magnésio, zinco, manganês e vitaminas. O meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) é classificado como natural, pois é à base de decocção de material natural (batata). O BDA é utilizado para o isolamento e manutenção de culturas como meio de rotina em laboratórios de fitopatologia (ZAUZA et al., 2007).

Em sementes, os danos causados por microrganismos são observados na forma de abortos, deformações, apodrecimentos, estromatizações, manchas

necróticas, descolorações da casca, dentre outros sintomas. Esses danos podem ocasionar perda do poder germinativo das sementes e constituem focos primários de infecção no campo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Em um trabalho realizado por Araújo et al. (2009), as sementes provenientes de frutos de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) coletados diretamente na planta apresentaram maior porcentagem de germinação e uma quantidade superior de plântulas normais, podendo ser relacionado com a menor ocorrência de fungos nessas sementes. Enquanto que, as sementes provenientes de frutos coletados no solo deram origem a uma maior porcentagem de plântulas anormais e sementes mortas. Nesse mesmo estudo, os autores verificaram que para as sementes coletadas no solo, *Fusarium* sp. foi o fungo de maior ocorrência, seguido do *Cladosporium* sp.. Já para as sementes coletadas na árvore, *Cladosporium* sp. foi o fungo de maior ocorrência, seguido do *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp..

Dentre os fungos de maior ocorrência em espécies florestais, *Fusarium* apresenta ampla distribuição. Considerado um fungo de solo, sua maior frequência ocorre nas sementes coletadas no solo, ocasiona, principalmente, tombamento de plântulas, apodrecimento de raízes e apodrecimento de estacas (FERREIRA, 1989).

Padulla et al. (2010) detectaram em sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) maior incidência de *Cladosporium cladosporioides*, *Pestalotiopsis maculans*, *Fusarium* sp. e *Epicoccum* sp. A incidência de *Fusarium* sp. foi detectada nas sementes coletadas após a deiscência, aumentando à medida que as sementes permaneceram no solo.

Alguns trabalhos de identificação de fungos associados as sementes de espécies florestais têm sido realizados, mas existe um desconhecimento nos danos causados nas mesmas e que prejudicam a produção de mudas. Em um estudo realizado com angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*), Dhingra et al. (2002) detectaram os fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium lateritium*, *F. semicetum*, *Pestalotiopsis* sp. e *Phomopsis dalbergiae*, os quais causaram podridão da semente e da raiz primária, reduzindo a altura e o número de plântulas.

De acordo com Leslie e Summerell (2006), o gênero *Fusarium* é um dos grupos de fungos mais importantes economicamente que infectam a maioria das culturas agrícolas e olerícolas no mundo, podendo ser encontrados na maioria das regiões bioclimáticas. De acordo com os mesmos autores, espécies de *Fusarium* foram relatadas como fungos patogênicos que causam diversas doenças tais como,

murcha vascular, apodrecimento de raízes, apodrecimento de frutos, sementes e tecidos de armazenamento, apodrecimento de haste e tronco, cancro, tombamento e doenças foliares.

2.4.3.1 *Fusarium* sp.

O gênero *Fusarium*, de acordo com a classificação taxonômica, constitui um estado anamorfo da ordem Hypocreales, filo Ascomycota (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Segundo os mesmos autores, características morfológicas têm sido utilizadas para a identificação de espécies de *Fusarium*. À forma dos macroconídios é dado o maior peso na definição de espécies, porém as diferenças na forma e tamanho dos mesmos podem ser confusas e subjetivas e, depende do meio em que foram produzidos. Além dos macroconídios, os microconídios e clamidósporos também são importantes na identificação.

A identificação de espécies de *Fusarium* através de métodos baseados em características morfológicas não fornece uma classificação totalmente segura. Dessa maneira, a análise molecular baseada nos ácidos nucleicos tem sido usada para demonstrar a diversidade genética de isolados individuais (HERMOSA et al., 2000). Assim, métodos moleculares baseados em análises de DNA são ferramentas que fornecem maior credibilidade aos estudos de filogenia de *Fusarium* (KURUMAE; SOUZA, 2002).

Espécies de *Fusarium* formam um grupo de fungos cosmopolita e é comum a sua ocorrência no solo, sendo a maioria dos sintomas de necrose de raízes de plantas em solos agrícolas colonizados por espécies desse gênero (NELSON et al., 1983). Em regiões temperadas e tropicais, espécies de *Fusarium* apresentam diferenças em termos de número de espécies, distribuição, gama de hospedeiros e virulência (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Espécies desse gênero são amplamente distribuídas em todo o mundo, e são bem conhecidas como agentes patogênicos de viveiros, ocasionando sintomas de pré-emergência e pós-emergência, “damping-off”, bem como redução da germinação de sementes em viveiros de coníferas (MÁRTIN-PINTO et al., 2008). Esses autores relatam que *Fusarium verticillioides* e *F. oxysporum* foram

responsáveis por causar “damping-off” em viveiros de produção de mudas florestais no noroeste da Espanha.

No Brasil, Poletto et al. (2012), relatam que uma das principais doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), em viveiro e, principalmente, a campo, é a podridão-de-raízes, causada por *Fusarium* spp. Segundo Maciel (2012), plântulas de *Pinus elliottii* apresentaram sintomas de murcha, tombamento, apodrecimento dos cotilédones e lesão seguida de ruptura do hipocótilo, devido a infecção das sementes com *Fusarium sambucinum*.

CAPÍTULO I

MATURAÇÃO FISIOLÓGICA E MÉTODOS DE COLETA DE SEMENTES DE *Cordia americana* (L.) GOTTSCHLING & J. S. MILL. E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA

RESUMO

O objetivo do trabalho foi determinar o ponto de maturidade fisiológica e o sistema de coleta mais favorável à qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Cordia americana* (guajuvira). A fenologia da espécie foi acompanhada durante os estágios de desenvolvimento e, após o início da maturação dos frutos, foram realizadas coletas de frutos na planta e no solo. Após as coletas foi determinado o teor de umidade das sementes, o período de máximo acúmulo de matéria seca, máxima germinação e vigor, além de outros índices de qualidade fisiológica. A qualidade sanitária foi determinada pela identificação dos microorganismos associados às sementes, dentre eles estão: *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Através dos testes de transmissão, foi verificada a ocorrência de *Fusarium* spp., causando sintomas de doença nas plântulas. Sementes oriundas de frutos coletados na planta atingiram valores superiores de germinação e vigor. Em relação aos fungos associados às sementes, verificou-se que a ocorrência de *Fusarium* sp. foi maior em sementes coletadas na planta, pois a associação do fungo em sementes pode ocorrer durante a maturação dos frutos.

Palavras-chave: Ponto de maturidade fisiológica. Patógenos em sementes. Guajuvira.

ABSTRACT**PHYSIOLOGICAL MATURITY AND COLLECTING METHODS OF *Cordia americana* (L.) GOTTSCHLING & J. S. MILL. SEEDS AND ITS RELATION TO PHYSIOLOGICAL AND SANITARY QUALITY**

The objective of this study was to determine the *Cordia americana* (guajuvira) physiological maturation point and the most favorable collecting system for the physiological and sanitary quality of its seeds. The phenology of this species was closely observed during the development stages and, after the maturation onset of its fruits, they were collected in the plant and its soil. After these collecting it was determined the moisture content of the seeds, the period of maximum dry weight accumulation, maximum germination and vigor, and other indexes of physiological quality. The sanitary quality was determined by identification of microorganisms associated with seeds, among them: *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. Through the transmission tests, it was found to occur *Fusarium* spp. causing disease symptoms in seedlings. Seeds collected from fruits in the plant reached superior germination and vigor rates, and lower number of seeds did not germinate. Regarding fungus associated with the seeds, it was found that the occurrence of *Fusarium* sp. was higher in seeds collected in the plant, because the association of the fungus in seeds may occur during fruit maturation.

Keywords: Point of physiological maturity. Seeds pathogens. Guajuvira.

3 INTRODUÇÃO

Na área florestal brasileira existem algumas espécies nativas que tendem a desaparecer devido à exploração desordenada das florestas. Dentre essas espécies, a *Cordia americana* (L.) Gottschling & J. S. Mill (guajuvira) apresenta carência de estudos nesse sentido, sendo considerada, segundo Carvalho (2003), uma espécie florestal nativa que apresenta alto valor comercial, indicada para o reflorestamento e paisagismo em geral.

A propagação da maioria das espécies florestais nativas ainda ocorre por via sexuada. Atualmente, existe uma preocupação constante por parte dos produtores de sementes em relação à época ideal de colheita. Nesse sentido, são necessárias informações a cerca da maturação fisiológica de sementes de cada espécie, bem como estudos e técnicas que venham contribuir para aumentar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes. Figliolia e Kageyama (1994), afirmam que o estudo da maturação das sementes é importante para se conhecer o comportamento das espécies em relação à sua reprodução, possibilitando, assim, prever o estabelecimento e a época adequada de colheita.

De acordo com Popinigis (1985) o ponto de maturidade fisiológica é atingido quando as sementes apresentam valores máximos de massa seca, poder germinativo e vigor. Medeiros et al. (2007), citam que após o ponto de maturação fisiológica, as sementes que permanecem no campo ficam sujeitas às condições ambientais adversas, que as deterioram progressivamente.

A contaminação fúngica em sementes de essências florestais, especialmente as das plantas nativas, é devido às características próprias dos frutos e do processo como as sementes são coletadas, beneficiadas e armazenadas. Normalmente, a colheita de sementes é realizada no solo, devido à inacessibilidade dos frutos em árvores de porte elevado, onde os frutos e sementes geralmente são colonizados por fungos diversos (FERREIRA, 1989).

Diante da escassez de informações sobre *Cordia americana*, o objetivo da presente pesquisa foi estudar o processo de maturação para determinar o ponto de maturidade fisiológica e o sistema de coleta mais favorável à qualidade fisiológica e sanitária de sementes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área de estudo

As sementes de guajuvira (*Cordia americana*) foram coletadas de três árvores matrizes plantadas em uma área situada na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), coordenadas geográficas de 29° 39' 45" de latitude Sul e 53° 55' 12" de longitude Oeste de Greenwich, localizada no município de Santa Maria, região fisiográfica da depressão central do Rio Grande do Sul (Figura 1).

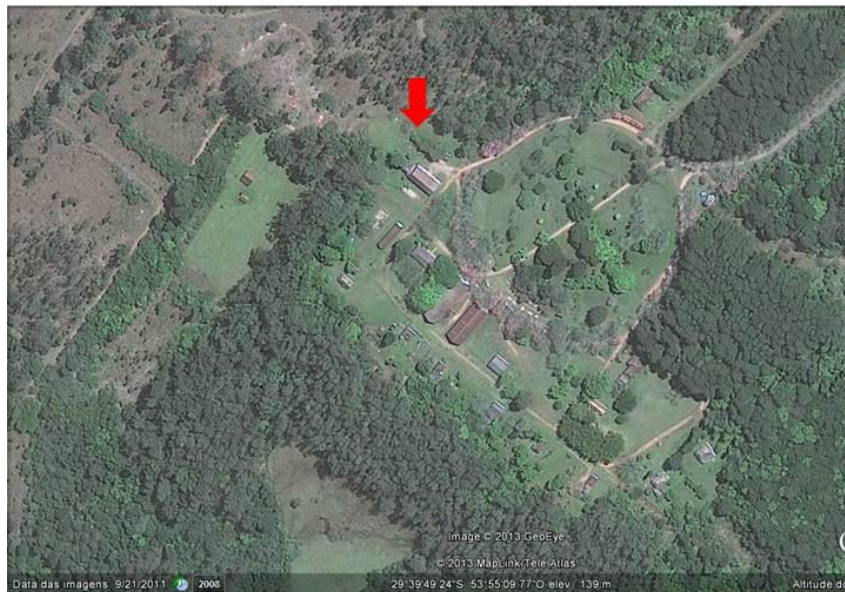


Figura 1 – Imagem da área de localização das árvores matrizes de *Cordia americana* na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), do Google Earth

As análises de sementes foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Fitopatologia, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria.

4.2 Acompanhamento dos eventos fenológicos

Foram realizadas observações das fenofases de floração e frutificação de cinco árvores, que foram selecionadas de acordo com suas características fenotípicas (vigorosas, boas condições fitossanitárias e boas produtoras de sementes). A marcação das árvores foi efetuada com etiquetas de metal numeradas e fita de trânsito zebraada. As observações fenológicas iniciaram-se no mês de outubro, desde o início da formação da estrutura floral até a abertura dos botões florais. Essa fenofase foi considerada o início da antese, representada pela abertura das flores até a queda das peças florais. A maturação dos frutos foi visualizada, desde o início da formação do fruto até o amadurecimento, ocorrido no mês de dezembro, observada pela transição da cor amarelada para marrom-claro.

4.3 Coleta e beneficiamento dos frutos

Os frutos foram coletados primeiramente no solo e após estendeu-se uma lona sob a copa das árvores e efetuou-se a coleta dos frutos extraídos da planta, procurando-se coletar na porção superior e inferior da copa nas quatro direções, com o auxílio de podão e escadas. Dessa maneira, os frutos da planta que caíram sob a lona foram coletados, evitando o contato com o solo. As coletas diretamente na planta e no solo foram efetuadas aos 52 e 55 dias após antese (DAA), correspondendo ao primeiro e segundo período de coleta (PC1 e PC2). Devido a rápida dispersão das sementes não foi possível dar continuidade para as coletas na copa, efetuando-se então coletas no chão em mais dois períodos (PC3 e PC4).

As amostras dos frutos foram devidamente identificadas de acordo com o método de coleta (sementes coletadas na planta e sementes coletadas no solo) e período (PC1, PC2, PC3 e PC4). Em seguida, as sementes foram acondicionadas em embalagens plásticas e encaminhadas ao laboratório. O beneficiamento foi realizado imediatamente após a coleta, através da retirada manual do cálice do fruto,

sendo que após esse procedimento, as sementes permaneceram em ambiente de laboratório para a secagem até o dia seguinte para a realização das análises.

4.4 Análise de sementes

4.4.1 Qualidade física das sementes

4.4.1.1 Teor de água e massa seca

O teor de água das sementes de *Cordia americana* foi determinado pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando-se três amostras de 25 sementes para cada período e método de coleta (sementes maduras coletadas na copa e sementes maduras coletadas no solo). Além disso, foi determinado o teor de água das sementes verdes coletadas na copa. Concomitantemente a esse teste, foi determinada a massa seca das sementes, pela verificação do peso final, após a retirada da estufa.

4.4.2 Qualidade fisiológica das sementes

4.4.2.1 Teste de germinação e primeira contagem

O experimento foi conduzido com quatro repetições de 25 sementes para cada método e período de coleta. As sementes foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 1% (v/v) e em seguida, por uma solução de etanol a 70% (v/v), ambos por 30 segundos e, após, lavadas em água destilada esterilizada. A semeadura foi em caixas “gerbox”, utilizando-se como substrato areia peneirada (≤ 2 mm de malha) e autoclavada por duas vezes (1 atm e 120°C por 60

minutos com intervalo de 24 horas). As caixas “gerbox” foram mantidas em câmara de germinação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. A contagem das sementes germinadas iniciou no décimo quinto dia (primeira contagem), após a instalação do teste, encerrando-se aos 35 dias. Na primeira contagem (PCG) foram avaliadas as plântulas normais e, aos 35 dias, plântulas normais, anormais, sementes duras e mortas. O critério adotado para formação de plântula normal foi a presença de todas as estruturas essenciais (raiz primária, hipocótilo e cotilédones), segundo a RAS (BRASIL, 2009).

4.4.2.2 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica (CE) das sementes foi determinada pelo método massal para cada período e método de coleta, utilizando-se quatro repetições de 25 sementes. As sementes foram previamente pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g e, posteriormente acondicionadas em copos de plástico, contendo 50 mL de água destilada por unidade. Os recipientes foram mantidos por 24 horas em câmara de germinação com temperatura de 25°C . Após o período realizou-se a leitura da condutividade elétrica na solução de embebição, utilizando-se o condutivímetro Quimis[®], e os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$.

4.4.3 Qualidade sanitária das sementes

Para a avaliação da qualidade sanitária foi utilizada para cada método e período de coleta uma amostra de 100 sementes, divididas em quatro repetições, com 25 sementes, distribuídas em caixas de plástico transparente (gerbox). As mesmas foram previamente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio comercial a 1% (v/v) e solução de álcool a 70% (v/v), forradas com duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada e esterilizada. A incubação foi realizada em câmara com temperatura controlada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias foram realizadas a quantificação e

identificação dos fungos, com o auxílio de microscópios estereoscópico e óptico, segundo Barnett e Hunter (1999).

4.5 Procedimento estatístico

O delineamento experimental utilizado para as avaliações da qualidade fisiológica e sanitária das sementes foi inteiramente casualizado, bifatorial 2 x 2, perfazendo quatro tratamentos com quatro repetições, sendo que o fator “A” referiu-se aos métodos de coleta (sementes coletadas na planta e sementes coletadas no solo) e o fator “B” referiu-se aos períodos de coleta (52 e 55 DAA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett. Devido a essas condições não ter sido atendidas, procedeu-se à transformação dos dados pela função arcoseno $(x/100)^{0.5}$.

Para a análise das variáveis germinação e vigor, das sementes coletadas no solo foi considerado os períodos de coleta, 52, 55, 58 e 61 dias após antese (DAA) como tratamentos, utilizando-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados de teor de água, massa seca e condutividade elétrica foram submetidos à análise de variância e de regressão polinomial, em função dos quatro períodos de coleta. Foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico, sendo selecionado o modelo significativo de maior ordem para explicar os resultados.

Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Acompanhamento dos eventos fenológicos

A época de florescimento, do início até a completa formação dos botões florais de *Cordia americana* iniciou-se em setembro de 2011, estendendo-se até novembro do mesmo ano. A data da antese ocorreu na segunda quinzena de outubro e, após 23 dias (final da primeira semana de novembro), as árvores matrizes já apresentavam poucas flores verificando-se o início da formação dos frutos. A deiscência dos frutos teve início aos 52 dias após a antese (final da primeira semana de dezembro), estendendo-se até o período compreendido entre 55 e 58 dias após antese. Esses resultados corroboram com as informações de Reitz et al. (1988), quando mencionam que a floração ocorre de setembro a novembro e que a frutificação se dá em novembro a janeiro. Observações semelhantes foram verificadas por Athayde et al. (2009) quando verificaram a ocorrência da floração da espécie de setembro a dezembro, com frutificação de outubro a dezembro.

5.2 Coleta dos frutos

As coletas dos frutos foram efetuadas em apenas três árvores, pois as outras duas matrizes não produziram frutos. Iniciou-se a coleta no dia 06, estendendo-se até o dia 16 de dezembro de 2011, aos 52 (PC1), 55 (PC2), 58 (PC3) e 61 (PC4) dias após antese (DAA), PC correspondendo ao período de coleta. Nos dois primeiros períodos de coleta (PC1 e PC2) foram efetuadas coletas de frutos na planta e no solo. Já nos dois últimos períodos foi realizada a coleta apenas no solo, devido à rápida dispersão dos frutos dessa espécie e dias de chuva, as árvores já haviam dispersado seus frutos.

5.3 Análise de sementes coletadas no primeiro (PC1) e segundo período de coleta (PC2) através dos métodos de coleta Solo X Planta

5.3.1 Teor de água, massa fresca e seca

Em relação aos dados de teor de água, massa fresca e seca verificou-se que não houve interação significativa entre o método de coleta e o período. Observou-se que os resultados do teor de água, massa fresca e seca das sementes não apresentaram diferença significativa entre o primeiro e segundo período de coleta (PC1 e PC2). O valor máximo para o teor de água das sementes foi de 12,66%, alcançado no PC2, aos 55 dias após antese (DAA). Resultados semelhantes de teor de água de sementes de *Cordia americana* foram verificados, atingindo valores de 12,4 e 11,04%, respectivamente pelos autores Steirnagel et al. (2012) e Aimi et al. (2011), apresentando semelhanças nas características fisiológicas das sementes de diferentes lotes, provenientes também da região central do Rio Grande do Sul.

O comportamento do teor de água verificado no presente trabalho pode ser explicado pelas informações de Carvalho e Nakagawa (2000), em que os autores relatam que alguns dias após a fecundação ocorre um pequeno acréscimo de umidade das sementes. O teor de água das sementes verdes também foi obtido nesses dois períodos de coleta, apresentando o mesmo comportamento descrito pelos autores, sendo que aos 52 DAA as sementes apresentaram 17,7% de umidade e aos 55 DAA teve um pequeno acréscimo para 18,08%.

Em relação à massa fresca das sementes verdes foi observado que as mesmas apresentaram aos 52 DAA valores médios de 1,033 gramas, enquanto que aos 55 DAA esse valor foi diminuindo para 1,025 gramas. Para a variável massa seca observou-se o mesmo comportamento, com valores médios de 1,029 gramas aos 52 DAA, passando para 1,022 gramas aos 55 DAA.

Quando avaliado a variável massa fresca das sementes maduras verificou-se que apresentaram valor maior no PC1 (1,075 g em média). No mesmo período foi verificado o máximo acúmulo de massa seca em relação ao PC2. Assim, verifica-se que através dessa informação de máxima matéria seca, aos 52 DAA (PC1), é possível recomendar a coleta de sementes nesse período. Carvalho e Nakagawa

(2000) recomendam realizar a colheita no ponto de máxima matéria seca da semente, para evitar perdas provenientes das adversidades do ambiente de campo, podendo ocorrer possível deterioração nas sementes.

Os dados referentes ao teor de água, quando analisado o método de coleta de sementes no PC1 e PC2 (Tabela 1), indicaram que as sementes coletadas no solo apresentaram menor teor de água (9,85%), diferenciando-se estatisticamente das coletadas na planta. Este fato pode ser explicado por alterações na impermeabilidade do tegumento das sementes, devido às sementes permanecerem expostas às condições adversas do ambiente.

Tabela 1 - Valores médios de teor de água (%), massa fresca e seca de sementes de *Cordia americana* obtidos pelo método de coleta do solo e planta do primeiro período de coleta (PC1) e segundo período de coleta (PC2).

Método	TU (%)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Solo	9,85 b	1,052 a	1,051 a
Planta	14,99 a	1,095 a	1,092 a
Média	12,42	1,073	1,071
CV (%)	10,98	4,74	4,69

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância. C.V.(%) = coeficiente de variação.

De acordo com a tabela 1, os dados de massa fresca das sementes não apresentaram diferença significativa entre os métodos de coleta. Com relação à massa seca, verificou-se que as sementes coletadas na planta obtiveram valores superiores de 1,092 g, embora não tenha diferença estatística significativa com as coletadas no solo (1,051 g). Segundo Braga Júnior (2009), as sementes após o desligamento da planta mãe passam a consumir seu material de reserva. Esse fato pode ser explicado pelas sementes coletadas no solo apresentarem menor conteúdo de massa seca.

5.3.2 Qualidade fisiológica de sementes

A análise da variância dos dados de primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais e sementes não germinadas (SNG) não apresentou interação significativa entre método e período de coleta. Para essas variáveis foram verificadas diferenças estatísticas significativas para o período de coleta (Tabela 2).

Os resultados obtidos pelo teste de condutividade elétrica (CE) não apresentaram diferenças estatísticas significativas para o período de coleta (Tabela 2), quando analisado apenas o PC1 e PC2. Porém, aos 55 DAA os valores de CE apresentaram valores médios superiores em relação aos 52 DAA, indicando, segundo Marcos Filho (2005) uma maior desestruturação das membranas e, conseqüentemente maior lixiviação de solutos para estas sementes. Carvalho e Nakagawa (2000) afirmam que o vigor de uma semente, durante a maturação, atinge seu máximo quando se apresenta com sua máxima massa seca. Dessa maneira, no presente estudo, o máximo vigor foi atingido aos 52 DAA, coincidindo com o máximo acúmulo de massa seca.

Tabela 2 - Valores médios de condutividade elétrica (CE) de sementes, primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas (SNG) de *Cordia americana* obtidos do primeiro período de coleta (PC1) e segundo período de coleta (PC2).

Período	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	PCG			
		(%)	Normais (%)	Anormais (%)	SNG (%)
PC1 (52 DAA)	39,88 a*	45,0 a	55,0 a	20,0 a	25,0 a
PC2 (55 DAA)	43,99 a	10,0 b	20,0 b	10,0 a	70,0 b
Média	41,93	27,5	37,5	15,25	47,25
CV (%)	11,88	42,39	23,84	46,97	16,23

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância. C.V.(%) = coeficiente de variação. DAA = Dias após antese

Comparando os períodos de coleta a porcentagem de plântulas normais na primeira contagem de germinação (PCG), constatou-se maior vigor das sementes aos 52 DAA (Tabela 2). Nesse período, foram contabilizadas 45% de plântulas

normais germinadas, diferindo significativamente do número de plântulas germinadas aos 55 DAA (10%). Em relação à porcentagem de plântulas normais, houve diferença significativa entre os períodos de coleta, sendo observados 55% e 20% de plântulas normais, respectivamente aos 52 e 55 DAA. Em um trabalho de maturação fisiológica de cedro, Corvello et al. (1999) observaram que o período de máxima germinação foi o de 31 semanas após antese, sendo atribuído ao período em que as sementes atingiram máximo peso de matéria seca.

No teste de germinação, constatou-se a presença de sementes não germinadas (SNG), sendo incluídas nessa categoria as sementes duras e mortas. Verificou-se que 70% das sementes não germinaram aos 55 DAA, diferindo significativamente das sementes coletadas aos 52 DAA (25%) (Tabela 2). A análise da variância para plântulas anormais não mostrou diferença significativa (Tabela 2).

Ao analisar o método de coleta no PC1 e PC2, pode-se constatar que não houve diferença estatística significativa para as variáveis CE, PCG, plântulas normais e plântulas anormais (Tabela 3). Apenas para a variável SNG foi observada uma maior porcentagem no método de coleta no solo (57%), diferindo significativamente com o método de coleta na planta, que apresentou 37,5% de sementes não germinadas. Pode-se inferir que o maior número de SNG no método de coleta do solo se deve ao fato da maior deterioração das sementes quando estas permanecem por maior período expostas às condições do ambiente.

Tabela 3 - Valores médios de condutividade elétrica (CE) de sementes, primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais, anormais e sementes não germinadas (SNG) de *Cordia americana* obtidos pelo método de coleta do solo e planta do primeiro (PC1) e segundo período de coleta (PC2).

Método	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	PCG (%)	Normais (%)	Anormais (%)	SNG (%)
Solo	39,42 a*	21,0 a	32,0 a	11,0 a	57,0 b
Planta	44,45 a	34,0 a	43,0 a	19,5 a	37,5 a
Média	41,93	27,5	37,5	15,25	47,25
CV (%)	11,88	42,39	23,84	46,97	16,23

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância. C.V.(%) = coeficiente de variação.

5.3.3 Qualidade sanitária das sementes

Na avaliação sanitária das sementes de *Cordia americana* foi detectado seis gêneros de fungos. Na tabela 4 encontram-se os fungos mais frequentes detectados nos períodos de coleta PC1 e PC2, dentre eles estão: *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. Verificou-se que não ocorreu interação significativa entre método e período de coleta, além disso, não ocorreu diferença significativa entre os fungos detectados nas sementes quando analisado o efeito do período de coleta.

Tabela 4 - Incidência de fungos (%) associados às sementes de *Cordia americana*, detectados pelo teste em papel-filtro, obtidos no primeiro (PC1) e segundo período de coleta (PC2) através dos métodos de coleta do solo e planta.

Período de coleta	Fungos					
	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>
PC1 (52 DAA)	35,5 a*	84,5 a	65,0 a	82,5 a	0,5 a	3,5 a
PC2 (55 DAA)	19,5 a	94,0 a	73,5 a	73,5 a	1,0 a	5,5 a
Método de coleta						
Solo	14,5 a	88,5 a	78,5 a	78,0 a	1,0 a	2,0 a
Planta	40,5 b	90,0 a	60,0 a	78,0 a	0,5 a	7,0 a
CV (%)	35,69	10,13	20,93	9,96	55,55	45,5

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância. C.V.(%) = coeficiente de variação. DAA = Dias após antese

Observando a tabela 4, em relação ao método de coleta, apenas *Fusarium* sp. diferiu significativamente entre as sementes coletadas na planta (40,5%) e no solo (14,5%). Embora esse patógeno seja considerado um fungo de solo (NELSON et al., 1983), a sua incidência foi maior nas sementes provenientes de frutos coletados na planta. Esse fato pode ser explicado por Machado et al. (2000), em que os autores relatam que as associações com fungos do gênero *Fusarium* podem ocorrer durante a maturação dos frutos. Menten e Bueno (1987) relatam que a infecção por *Fusarium* spp. pode ocorrer através do pedúnculo de flores e frutos e do pedúnculo da semente, ou pela superfície íntegra da semente.

5.4 Análise de sementes coletadas no solo

5.4 1 Teor de água

O teor de água das sementes durante os períodos de coleta realizadas no solo não apresentou efeito significativo de ordem linear, quadrática ou cúbica. No entanto, na figura 2 observa-se o comportamento do teor de água durante os períodos de coleta em uma curva de ordem quadrática. Aos 52 DAA as sementes apresentaram teor de água de 9,5%. Após esse período, houve aumento crescente até 58 DAA, em que as sementes atingiram em torno de 10,9% de umidade. A partir desse período, aos 61 DAA, um pequeno percentual de redução para essa variável foi verificado, sendo que as sementes atingiram em torno de 10,3% de umidade.

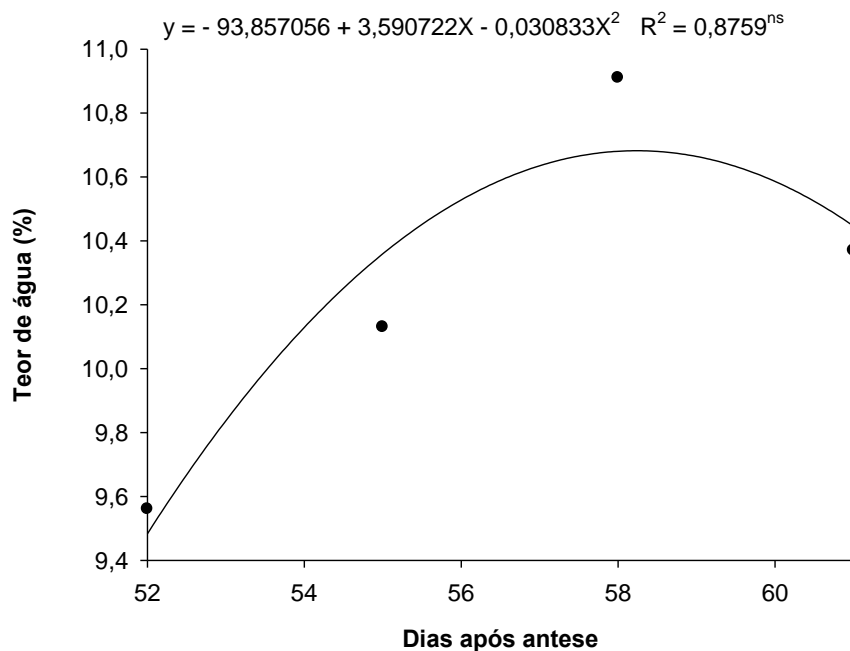


Figura 2 - Teor de água das sementes de *Cordia americana* coletadas no solo

Essa redução do teor de água pode estar relacionada ao tempo de exposição das sementes às condições climáticas, sendo que a partir desse período pode-se inferir que as sementes iniciariam o processo de desidratação e perda da

viabilidade. Carvalho e Nakagawa (2000) relatam que a desidratação das sementes pode ser influenciada pelas condições climáticas, ocorrendo oscilações de acordo com a umidade relativa do ar.

5.4.2 Massa seca

A massa seca das sementes coletadas no solo ao longo dos períodos de coleta não apresentou efeito significativo de ordem linear, quadrática ou cúbica. Na figura 3 é possível verificar, em uma curva de ordem quadrática, um aumento crescente para essa variável ao longo do período avaliado. Carvalho e Nakagawa (2000) descrevem resultado semelhante para o acúmulo de massa seca em uma semente, em que, inicialmente, os acréscimos ocorrem de maneira lenta, em seguida ocorre uma fase de rápido acúmulo, até que o máximo é atingido, o qual se mantém por algum tempo, e após um pequeno decréscimo pode ser verificado devido às perdas pela respiração.

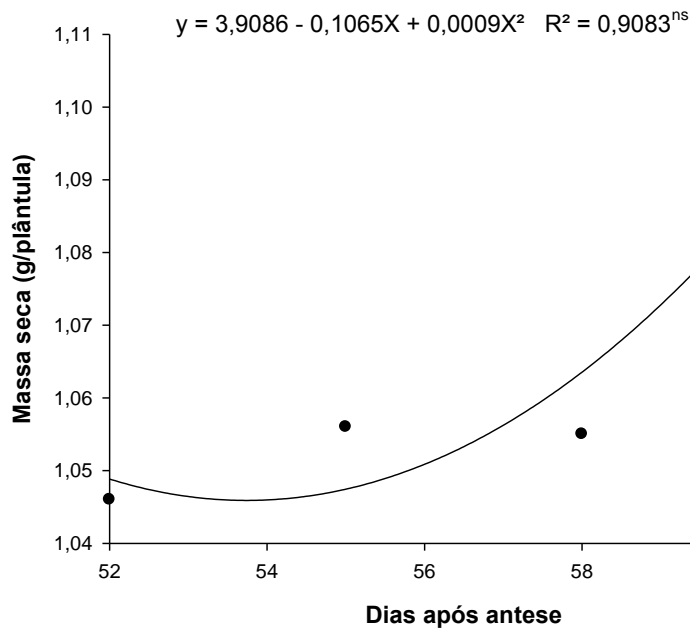


Figura 3 - Acúmulo de massa seca de sementes de *Cordia americana* coletadas no solo

Aos 61 DAA foi possível verificar uma redução do conteúdo de água (Figura 2) e aumento da massa seca (Figura 3). De acordo com Castro et. al. (2004), esse comportamento segue o desenvolvimento padrão em sementes, ou seja, após a fase de desenvolvimento inicial ocorre a substituição do conteúdo de água pela matéria seca.

5.4.3 Germinação e vigor

Referindo-se aos dados da primeira contagem de germinação (Tabela 5), verificou-se que a primeira contagem de plântulas normais foi máxima (46%) aos 58 DAA, porém não apresentando diferenças significativas com as sementes coletadas aos 52 e 61 DAA, com 34 e 32%, respectivamente.

Os dados referentes à germinação (Tabela 5) apresentaram máxima porcentagem de germinação (51%) verificada em dois períodos, aos 52 e 58 DAA, sem diferenças entre si e com as sementes coletadas aos 61 DAA (31,0%). Essa porcentagem de germinação é considerada baixa quando comparada com outros trabalhos. Aimi et al. (2011) verificaram 72% de germinação quando utilizado o substrato entre areia (EA), sendo o mesmo, segundo os autores, um dos mais indicados na germinação de *Cordia americana*, além de outros como sobre vermiculita e entre vermiculita. Os autores Steirnagel et al. (2012) verificaram 82% de germinação para a mesma espécie através do tratamento sobre areia (SA) como substrato.

Tabela 5 - Valores médios de primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas (SNG) de *Cordia americana* obtidos de sementes coletadas no solo ao longo dos períodos de coleta

Período	PCG (%)	Normais (%)	Anormais (%)	SNG (%)
PC1 (52 DAA)	34,0 ab	51,0 a	15,0 a	34,0 a
PC2 (55 DAA)	8,0 b	13,0 b	7,0 a	80,0 b
PC3 (58 DAA)	46,0 a	51,0 a	18,0 a	31,0 a
PC4 (61 DAA)	32,0 ab	31,0 ab	21,0 a	48,0 ab
Média	30,00	36,50	15,25	48,25
CV (%)	33,01	24,44	40,84	16,73

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância. C.V.(%) = coeficiente de variação. DAA = Dias após antese

Aos 55 e 61 DAA foi verificado maior número de sementes não germinadas (SNG), apresentando respectivamente, 80 e 48,25%, sem diferenças estatísticas entre os dois períodos.

De acordo com a Instrução Normativa nº 26 do MAPA, de 10 de setembro de 2012, a primeira contagem de germinação para a espécie *Cordia americana* deve ser realizada no 10º dia e, a avaliação final, aos 17 dias após a instalação do teste. Ainda, nessa IN é recomendado o uso do substrato sobre areia (SA) para a realização do teste. Neste trabalho foi utilizado o substrato entre areia (EA) e a primeira contagem realizada no 15º dia encerrando-se aos 35 dias, pois no período da realização desse estudo ainda não haviam sido publicadas na RAS as recomendações para a realização do teste de germinação para essa espécie.

5.4.3.1 Condutividade elétrica

Os dados de condutividade elétrica de sementes de *Cordia americana* apresentaram efeitos significativos de ordem quadrática (Figura 5). Através desse teste de vigor verificou-se que o menor valor obtido ($39,3 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) foi para as sementes coletadas aos 52 DAA, indicando melhor estruturação das membranas e conseqüentemente, menor lixiviação de solutos para estas sementes.

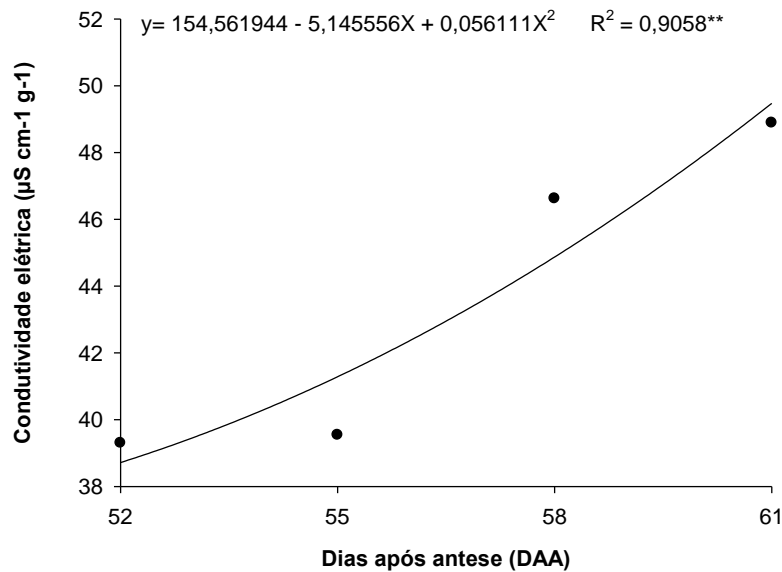


Figura 4 - Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) de sementes de *Cordia americana* coletadas no solo.

Nas coletas subsequentes, foi observado aumento gradativo, sendo que aos 61 DAA a condutividade elétrica das sementes atingiu $48,9 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$. Os valores maiores devem ser resultado da pior estruturação das membranas ocasionado, provavelmente, pelo início de deterioração das sementes devido à permanência das mesmas por prolongado período de tempo expostas no solo sob condições climáticas desfavoráveis.

5.4.4 Qualidade sanitária

Pode-se constatar pelos resultados encontrados na tabela 6, que os fungos *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e *Alternaria* sp. estavam presentes e apresentaram maior incidência nas sementes em todos os períodos de coleta. Segundo Villela e Peres (2004), as sementes quando coletadas após a queda ao solo são favorecidas ou não ao desenvolvimento dos fungos, pois as mesmas ficam expostas a flutuações de temperatura, umidade relativa, orvalho, chuva, entre outros fatores. No entanto, como observado na tabela 4, quando avaliado o efeito do método de coleta

no PC1 e PC2 sobre a incidência de fungos, verificou-se que os mesmos fungos estavam associados às sementes na planta. *Fusarium* spp. é considerado fungo de campo, ou seja, pode infectar as sementes no período de crescimento e maturação (Wetzel, 1987).

Tabela 6 - Incidência de fungos (%) associados às sementes de *Cordia americana* coletadas no solo, detectados pelo teste em papel-filtro.

Período de coleta	Fungos				
	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Coletotrichum</i>
PC1	17 a*	84 a	71 a	0 a	78 b
PC2	12 a	93 a	86 ab	0 a	78 b
PC3	44 b	100 a	100 b	94 b	0 a
PC4	7,0 a	98 a	88 ab	87 b	0 a
CV (%)	27,13	4,26	5,83	11,9	14,21

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância. C.V.(%) = coeficiente de variação.

A maior incidência de *Fusarium* sp. foi detectada no PC3 (44%), apresentando diferença estatística significativa com os demais períodos de coleta (Tabela 6). No PC4 sua incidência foi diminuída significativamente (7,0%), provavelmente a queda no teor de água das sementes pode explicar sua diminuição, pois de acordo com Wetzel (1987), o desenvolvimento dos fungos de campo requer alta umidade. Através de um estudo realizado com o objetivo de verificar a incidência de fungos durante o processo de formação e dispersão das sementes de pau-brasil, Padulla et al. (2010) observaram que a incidência do fungo *Fusarium* sp. foi detectada após deiscência, aumentando a medida que as sementes permaneceram no solo.

De acordo com a tabela 6, os fungos *Cladosporium* sp. e *Alternaria* sp. apresentaram grande incidência, chegando a atingir 100% nas sementes coletadas no PC3. Em relação ao fungo *Cladosporium* sp., o mesmo não apresentou diferença significativa entre os períodos de coleta. Esse patógeno foi verificado associado às sementes coletadas na planta no PC1 e PC2 (Tabela 4), corroborando com os resultados de Padulla et al. (2010), onde informam que *Cladosporium cladosporioides* pode infectar as sementes por inóculo da planta-mãe ou por inóculo

externo ainda na árvore de pau-brasil. Faiad et al. (2004), em um estudo com diversas espécies florestais, constataram a associação de *Cladosporium* sp., em alta frequência; segundo os autores, esse patógeno pode causar descoloração das sementes e redução da germinação.

A incidência de *Phomopsis* sp. foi observada apenas no PC3 (94%) e PC4 (87%), com alta incidência nas sementes de *Cordia americana*, não apresentando diferença estatística significativa entre os dois períodos. O fungo *Colletotrichum* sp. foi verificado no PC1 e PC2, com alta frequência em ambos o períodos (78%) (Tabela 6).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podem-se chegar as seguintes conclusões:

- A maior qualidade fisiológica das sementes de *Cordia americana* ocorre aos 52 dias após antese, coincidindo com o maior acúmulo de massa seca;
- Sementes coletadas na planta alcançaram maior qualidade fisiológica do que as coletadas no solo;
- A ocorrência de *Fusarium* sp. foi maior em sementes coletadas na planta do que no solo;
- *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. foram identificados associados às sementes, porém sem diferenças entre os locais de coleta.

CAPÍTULO II

PATOGENICIDADE DE *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* ASSOCIADO ÀS SEMENTES DE *Cordia americana* (L.) GOTTSCHLING & J. S. MILL.

RESUMO

Cordia americana (L.) Gottschling & J.S.Mill. (guajuvira) é uma espécie florestal amplamente distribuída no território brasileiro e que apresenta importância econômica e ambiental devido à qualidade de sua madeira e utilização em reflorestamentos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade de *Fusarium* sp. associado às sementes, caracterizando os isolados de forma morfológica e molecular com vistas a identificá-los em nível de espécie. Obtiveram-se quatro isolados do fungo que foram inoculados nas sementes para comprovar a patogenicidade. A caracterização morfológica foi realizada através de uma chave de identificação para o gênero *Fusarium* e, para a identificação molecular foram sequenciadas as regiões genômicas ITS e fator de alongação 1- α . Os resultados da identificação molecular concordaram com a caracterização morfológica e permitiram identificar as espécies *F. acuminatum* e *F. verticillioides*, sendo ambas patogênicas a *C. americana*, causando tombamento em pré e pós-emergência, além de apodrecimento de raízes e necrose no hipocótilo.

Palavras chave: Tombamento de plântulas. Guajuvira. Caracterização morfológica. Caracterização molecular.

ABSTRACT**PATHOGENICITY OF *Fusarium acuminatum* and *Fusarium verticillioides* ASSOCIATED WITH *Cordia americana* GOTTSCHLING & J. S. MILL. SEEDS**

Cordia americana (L.) Gottschling & J. S. Mill. (guajuvira) is a forest species widely distributed in Brazil and represents environmental and economic importance due to the quality of its timber and use in reforestation. The aim of this study was to evaluate the pathogenicity of *Fusarium* sp. associated with seeds, characterizing the isolates morphologically and molecularly in order to identify them on the species level. It was obtained four fungal isolates that were inoculated in seeds to demonstrate their pathogenicity. The morphological characterization was performed using an identification key for the genus *Fusarium* and, for the molecular identification, genomic regions ITS were sequenced with its elongation factor 1- α . The results of the molecular identification agreed with the morphological characterization and allowed to identify the species *F. acuminatum* and *F. verticillioides*, both being pathogenic to *C. americana*, causing damping-off in pre and post emergence, and rotting of roots and necrosis of hypocotyl.

Keywords: Guajuvira, Morphological characterization, Molecular characterization.

7 INTRODUÇÃO

Dentro do gênero *Fusarium*, as espécies *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg), *Fusarium proliferatum* ((Matsushima) Nirenberg) e *Fusarium subglutinans* ((Wollenweber) e Reinking) participam de um grupo de aproximadamente 20 espécies que compõem o complexo *Gibberella fujikuroi* (LESLIE; SUMMERELL, 2006), e estão associadas a doenças de diversas culturas de importância econômica, dentre elas o milho, trigo e cana-de-açúcar.

Fusarium spp. é conhecido também como patógeno causador de danos em viveiros florestais ocasionando apodrecimento de raízes em mudas velhas e também tombamento em pré e pós-emergência, reduzindo a germinação de sementes e a sobrevivência de mudas (MACHON et al., 2009).

A correta identificação de espécies de *Fusarium* spp. associada às sementes de *Cordia americana*, espécie florestal nativa de importância econômica e ambiental, é muito importante para a condução de estratégias de controle do patógeno. De acordo com Summerell et al. (2003) a identificação de espécies, antigamente, era mais subjetiva baseada apenas em aspectos morfológicos, porém no novo paradigma, abrange além dos critérios biológicos, critérios filogenéticos baseado em informações moleculares.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a patogenicidade de *Fusarium* spp. associados as sementes de *Cordia americana*, caracterizando os isolados de forma morfológica e molecular com vistas a identificá-los em nível de espécie.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Teste de transmissão de fungos via sementes

O experimento foi conduzido, para cada método (sementes coletadas na planta e sementes coletadas no solo) e período de coleta (52 e 55 dias após antese), com 100 sementes, sem assepsia, divididas em quatro repetições de 25 sementes. A semeadura foi em caixas “gerbox”, utilizando-se como substrato a areia peneirada (≤ 2 mm) e autoclavada por duas vezes (1 atm e 120°C por 60 minutos com intervalo de 24 horas).

Avaliaram-se as plântulas com sintomas, aos 35 dias, colocando-se as mesmas em câmara úmida para a identificação dos patógenos. As plântulas foram colocadas em caixas “gerbox”, previamente desinfestadas (solução de hipoclorito de sódio comercial a 1% (v/v) e solução de álcool a 70%(v/v), contendo duas folhas de papel-filtro umedecido com água destilada e esterilizada. As caixas “gerbox” foram mantidas em câmara com temperatura controlada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, sendo realizada posteriormente a identificação dos fungos.

Os fungos potencialmente patogênicos (*Fusarium* spp.) foram isolados das plântulas que apresentavam sintomas e cultivados em meio BDA. Os isolados obtidos foram utilizados para o teste de patogenicidade.

8.2 Isolamento dos fungos

No teste de transmissão observou-se que *Fusarium* spp. foi transmitido da semente para a plântula, onde esse fungo, potencialmente patogênico, causou danos às mesmas. Nas plântulas onde foram verificados os sintomas e a presença de micélio de *Fusarium* spp., procedeu-se o isolamento do fungo para placas de Petri contendo BDA suplementado com 4,0 mg de sulfato de estreptomicina (concentração de 70%) para 100 mL de meio, utilizado para prevenir a

contaminação por bactérias. Foram obtidos quatro isolados de *Fusarium* spp. para serem utilizados no teste de patogenicidade, e esses foram obtidos de plântulas com sintomas, oriundas de sementes obtidas nos seguintes estágios de maturação e locais de coleta: o isolado F1 de sementes verdes coletadas na copa; o isolado F2 de sementes maduras coletadas na copa; o isolado F3 e F4 de sementes maduras coletadas no chão.

Para purificação dos isolados foi utilizada a técnica da cultura monospórica, onde foi feita a repicagem com apenas uma unidade formadora de colônia (UFC). Para isso, alíquotas de micélio de *Fusarium* spp. foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após 10 dias, pequenas porções do micélio dos fungos foram colocadas em 5 ml de água destilada e esterilizada, agitadas e plaqueadas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA). Após a germinação dos esporos (24 horas em temperatura ambiente), com o auxílio do microscópio óptico, um único esporo germinado foi retirado e transferido para placas contendo meio de cultura BDA e, posteriormente incubados a temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas (FERNANDEZ, 1993).

Após 10 dias de incubação, as placas contendo a cultura monospórica foram utilizadas para a realização do teste de patogenicidade, além de outros trabalhos que serão descritos a seguir.

8.3 Patogenicidade de *Fusarium* spp. em sementes de *Cordia americana*

Para a realização do teste de patogenicidade, foi utilizado o método de contato com a cultura fúngica, através da inoculação de isolados de *Fusarium* sp. em sementes de *Cordia americana*.

Foram utilizadas sementes obtidas na primeira coleta, do solo e da planta, pois nesse período obteve-se a melhor germinação das mesmas. Inicialmente, as sementes foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 1% (v/v) (30 segundos), em seguida com uma solução de álcool a 70% (v/v) (30 segundos) e, após, lavadas em água destilada e esterilizada. Após esse procedimento, as sementes foram dispostas em papel-filtro esterilizado para retirar a umidade. Utilizou-se 100 sementes para cada tratamento (Tabela 7), divididas em

quatro repetições de 25. Posteriormente, as sementes foram dispostas em contato com a cultura fúngica, com exceção das duas testemunhas (sementes coletadas do solo e da planta), que foram colocadas apenas em meio de cultura BDA. As sementes permaneceram em contato com o patógeno por um período de 48 horas (temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas).

Tabela 7 - Tratamentos utilizados para o teste de patogenicidade, com o método de coleta (solo/planta) das sementes e seus respectivos isolados de *Fusarium* sp. (F1, F2, F3, F4).

Tratamentos	Método de coleta/Isolados de <i>Fusarium</i> spp.
T1	Solo + F1
T2	Solo + F2
T3	Solo + F3
T4	Solo + F4
T5	Planta + F1
T6	Planta + F2
T7	Planta + F3
T8	Planta + F4
T9 - Testemunha	Planta + Sem inoculação
T10 - Testemunha	Solo + Sem inoculação

Após o período de inoculação, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor de 200 células, contendo substrato comercial, previamente autoclavado por duas vezes (1 atm e 120°C por 60 minutos com intervalo de 24 horas). As bandejas permaneceram em casa de vegetação localizada no Viveiro Florestal Juarez Martins Hoppe pertencente ao Centro de Ciências Rurais na Universidade Federal de Santa Maria, com irrigação através de uma barra móvel de microaspersores, durante um período de 57 dias.

Foram realizadas avaliações de contagem diária (início da contagem no 14º dia após a semeadura) do número de plântulas normais emergidas durante 43 dias, para determinar o índice de velocidade de emergência (IVE), de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962); onde

$$IVE = \left(\frac{N1}{D1}\right) + \left(\frac{N2}{D2}\right) + \dots + \left(\frac{Gn}{Nn}\right),$$

sendo N = número de plântulas emergidas e D = número de dia após a semeadura

Durante o período de emergência, as plântulas com sintomas de tombamento de pós-emergência, foram retiradas e colocadas em câmara úmida e mantidas, durante sete dias, em temperatura controlada a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, para o reisolamento do patógeno.

Aos 57 dias após a semeadura, avaliou-se o número de plântulas normais e anormais emergidas e sementes não germinadas (duras e mortas). Contabilizou-se também o número de plântulas que apresentaram sintomas de tombamento de pré e pós-emergência.

8.3 Caracterização morfológica dos isolados

8.3.1 Crescimento micelial

O crescimento micelial é um dos critérios utilizados para definir a espécie na chave de classificação de Nelson et al. (1983). Para a determinação do crescimento micelial dos quatro isolados de *Fusarium* sp., foram utilizadas as culturas monospóricas descritas anteriormente, onde retirou-se discos de micélio de 8 mm de diâmetro. Os discos foram transferidos para o centro da placa de Petri, contendo meio de cultura BDA e, posteriormente as mesmas foram incubadas na temperatura de 25 ± 2 °C e em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição, a cada 24 horas, do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de um paquímetro digital. Concluíram-se as leituras quando o crescimento da colônia cobriu completamente o diâmetro da placa, determinando-se a velocidade média de crescimento para cada placa (cm/dia). Através desses dados foi possível calcular o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) para cada isolado, utilizando-se a fórmula proposta por Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991):

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

Onde:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

D = diâmetro médio atual da colônia.

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior.

N = número de dias após a inoculação.

8.3.2 Coloração da colônia fúngica

A coloração da colônia foi determinada com o auxílio de literatura (NELSON et al. 1983), através da observação da coloração produzida pelo fungo em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA. Inicialmente, para a preparação do material, transferiu-se uma alíquota de micélio do fungo para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA e incubou-se por 10 dias, em temperatura de 25 ± 2 °C e em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 horas.

8.3.3 Análise das estruturas reprodutivas em meio de cultura folha de cravo (CLA)

Os isolados foram transferidos para o meio de cultura Folha de Cravo-Ágar (CLA), que é um meio específico para o crescimento e esporulação de *Fusarium*. Nesse meio, conídios e conidióforos são produzidos em abundância e a morfologia se aproxima daquela que se observa em condições naturais, além da redução das variações fenotípicas (NELSON et al., 1983).

A caracterização morfológica foi feita baseada na chave de classificação de Nelson et al. (1983) e descrições feitas por Gerlach e Nirenberg (1982). Após 20 dias de crescimento da cultura, foram observadas as seguintes características morfológicas: formação de esporodóquio e características dos macroconídios

(medidas de comprimento e largura, número de septos e forma da célula basal e apical), ausência/presença de clamidósporo, tipo de célula conidiogênica (monofiálide ou polifiálide), disposição dos microconídios sobre a célula conidiogênica (em cadeia ou “falsa cabeça”). As dimensões de 15 macroconídios, selecionados de forma arbitrária, foram obtidas em microscópio de contraste Olympus BX41[®] na objetiva de 40x, com o auxílio de uma ocular OSM acoplada ao microscópio.

A chave de classificação de Nelson et al. (1983) divide as espécies de *Fusarium* em seções, conforme as similaridades morfológicas das espécies. Dessa maneira, os isolados de *Fusarium* spp. foram inseridos dentro dos grupos, para posterior identificação em nível de espécie.

8.4 Caracterização Molecular dos Isolados

Para a extração de DNA, os isolados fúngicos foram cultivados em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 horas. O material foi enviado para o Laboratório de Bioquímica Fitopatológica (Instituto Biológico, São Paulo) para o sequenciamento genético.

A extração do DNA foi efetuada pelo método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) (Doyle e Doyle, 1991). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a amplificação das regiões: ITS do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990); fator de alongação alfa, com o par de primers EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1-1567R (ACHGTRCCRATAACCACCRATCTT) (REHNER e BUCKLEY, 2005).

A reação continha aproximadamente 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5 μM de cada dNTP, 20 nM de MgCl_2 , 25 μmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, cinco unidades da enzima Taq polimerase e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 $^\circ\text{C}$ por 2

min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 35 s e 72 °C por 10 min. Ao final da reação, os produtos da PCR foram mantidos a 4°C. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE 1X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 4 ml de EDTA a 0,5 M e 4 ml de água destilada), contendo brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 a 13% e, nas reações de sequenciamento para os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4, as sequências geradas continham de 400 a 900 pb, tamanho referente ao segmento que corresponde às regiões ITS1, 5.8S e ITS2. Para a região de codificação do fator de alongação alfa foram utilizados fragmentos de 1100 pb.

O sequenciamento foi efetivado em sequenciador Mega BACE 500 (Amersham). Sequências de *Fusarium* spp. obtidas foram analisadas pelo Blast contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information *website* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). As sequências do *GenBank* que apresentaram os maiores “escores” foram selecionadas e alinhadas, juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW, utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). A análise filogenética foi conduzida adotando-se o método “*Neighbour-joining*” com 1000 replicatas pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al, 2007). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

8.5 Procedimento estatístico

O delineamento experimental para o teste de transmissão foi inteiramente casualizado, bifatorial 2 x 2, perfazendo quatro tratamentos com quatro repetições, sendo que o fator “A” referiu-se aos métodos de coleta (sementes coletadas na planta e sementes coletadas no solo) e o fator “B” referiu-se aos períodos de coleta (52 e 55 DAA).

Para o teste de patogenicidade, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 2 x 5, com quatro repetições para cada teste realizado. O fator “A” referiu-se aos métodos de coleta (sementes

coletadas na planta e sementes coletadas no solo) e o fator “B” referiu-se aos isolados de *Fusarium* spp. (F1, F2, F3, F4 e Testemunha).

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett. Devido a essas condições não ter sido atendidas, procedeu-se à transformação dos dados pela função arcoseno $(x/100)^{0.5}$.

Para as variáveis diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial, o delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado e, os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão polinomial, em função do tempo em horas. Foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico, sendo selecionado o modelo significativo de maior ordem para explicar os resultados.

Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado para a comparação das médias o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2009).

9 RESULTADOS E DISCUSSÕES

9.1 Avaliação da patogenicidade de isolados de *Fusarium* sp. associado a sementes de *Cordia americana* (L.) Gottschling & J. S. Mill.

Os resultados da avaliação da emergência de plântulas, após a inoculação de isolados de *Fusarium* sp. podem ser observados na tabela 8. Verificou-se que não houve interação entre o isolado e o método de coleta de sementes. A análise de variância para os dados de plântulas normais e sementes não germinadas não mostrou diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 8), demonstrando que os isolados de *Fusarium* sp. não apresentaram efeito significativo sobre essa variável, pois na testemunha também foi verificado valores altos de sementes não germinadas e baixa porcentagem de plântulas normais.

Após esse experimento, foi avaliado o lote de sementes que foram utilizadas para esse trabalho, sendo verificada a ocorrência de *Fusarium* sp. localizado internamente na semente, esse fato pode ser um dos fatores que ocasionou a baixa qualidade desse lote. Assim, constatou-se que a assepsia realizada em todos os tratamentos não foi eficiente, pois o patógeno estava localizado no interior da semente. Sá et al. (2011) destaca que entre os agentes patogênicos, os fungos tem maior habilidade em penetrar e estabelecer-se internamente nos tecidos vegetais.

Tabela 8 - Valores médios de plântulas normais, sementes não germinadas (SNG), tombamento em pré e pós-emergência, após inoculação de isolados de *Fusarium* sp. (F1, F2, F3, F4) em sementes de *Cordia americana* coletadas na planta e solo.

Isolado	Plântulas normais (%)	SNG (%)	Tombamento Pré-emergência (%)	Tombamento Pós-emergência (%)
F1	39,0 a	59,5 a	0,5 a	1,0 a
F2	30,0 a	61,5 a	4,0 a	2,0 a
F3	38,0 a	55,0 a	6,0 a	0 b
F4	28,5 a	65,0 a	5,0 a	0,5 b
Testemunha	31,0 a	65,0 a	3,0 a	0 b
Média (%)	33,30	61,30	3,70	0,70
CV (%)	14,01	8,22	68,53	48,76

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott 5% de significância. C.V.(%) = coeficiente de variação.

Diversos trabalhos já foram publicados sobre tombamento de plântulas de espécies florestais, causados por diversas espécies de *Fusarium* sp.. Maciel (2012) verificou em plântulas de *Pinus elliottii* a ocorrência de *Fusarium sambucinum* provocando sintomas de tombamento, murcha e apodrecimento dos cotilédones. A redução da germinação de sementes causada por *Fusarium* sp. em coníferas foi também relatada por Martín-Pinto et al. (2008).

No presente trabalho, quanto aos sintomas observados de tombamento em pré-emergência (Figura 6A e C), causados por *Fusarium* sp., pode-se constatar que não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 8), no entanto, em todos os tratamentos foi observado o sintoma.

Na figura 6B é possível observar que ocorreu o sintoma de tombamento em pós-emergência em plântulas de *Cordia americana*, sendo observado apodrecimento das raízes (Figura 6D e E), necrose do hipocótilo seguida de ruptura. Após a realização de câmara úmida com o material com sintomas, foi possível observar o crescimento de micélio de *Fusarium* sp. (Figura 6F e G).

Conforme pode ser observado na tabela 8, independente das sementes serem provenientes do solo ou planta, os isolados F1 e F2 causaram 1% e 2%, respectivamente, de tombamento em pós-emergência, apresentando diferenças

estatísticas entre os demais tratamentos, que por sua vez não diferiram entre si. O tratamento sem inoculação de *Fusarium* não apresentou o sintoma e não teve diferenças significativas entre as inoculações com os isolados F3 e F4. Lazarotto et al. (2010) verificaram que *Fusarium* sp. foi patogênico causando os sintomas de tombamento de plântulas de paineira (*Ceiba speciosa*), além de podridões de raízes. No noroeste da Espanha, Martín-Pinto et al. (2008) relatou também tombamento em pós-emergência em mudas de *Pinus nigra* causados por *F. verticillioides* e *F. oxysporum*, sendo observado a mortalidade de 65,6 e 61,3%, respectivamente.

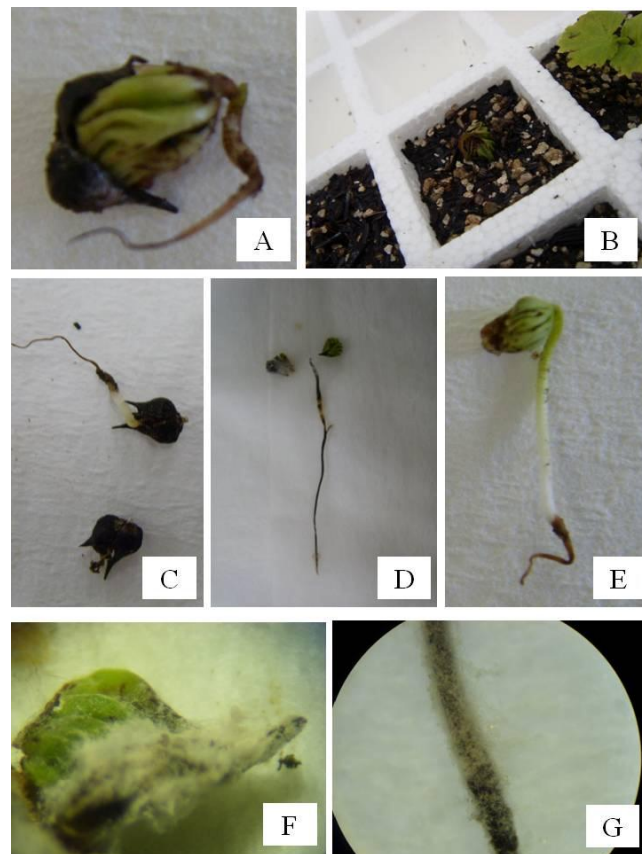


Figura 5 - Sintomas observados em plântulas no teste de patogenicidade. Tombamento em pré-emergência de plântula (A e C); tombamento em pós-emergência (B) apodrecimento de raiz (D e E), lesão e posterior ruptura do hipocótilo (D); micélio de *Fusarium* sp. nos cotilédones e raiz (F e G).

Em relação ao percentual de plântulas anormais (Tabela 9) constatou-se interação dos fatores métodos de coleta e isolados de *Fusarium* sp.. Quando foi

inoculado o isolado F4, verificou-se efeito significativo entre os métodos de coleta, ocasionando um maior percentual de plântulas anormais quando inoculado em sementes coletadas na copa (12%), enquanto que nas sementes do solo apresentou apenas 1% para essa variável.

Tabela 9 - Valores médios de plântulas anormais (%), após inoculação de isolados de *Fusarium* sp. (F1, F2, F3, F4) em sementes de *Cordia americana* coletadas na planta e solo.

Isolado	Método		Média (%)
	Solo	Planta	
F1	3,0 a A	0,0 a A	1,5
F2	10,0 b A	7,0 a A	8,5
F3	9,0 b A	5,0 a A	7,0
F4	1,0 a A	12,0 a B	6,5
Testemunha	2,0 a A	5,0 a A	3,5
Média (%)	5,0	5,8	5,4
CV (%)		48,38	

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. C.V.(%) = coeficiente de variação.

9.2 Índice de velocidade de emergência (IVE)

De acordo com os resultados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), verificou-se que não houve interação entre o método de coleta e os isolados de *Fusarium* sp. inoculados nas sementes. Não foi verificado efeito significativo do método de coleta, apenas para o fator isolado. Nas sementes inoculadas com os isolados F1 e F3, independente da proveniência das sementes, os tratamentos produziram efeito significativo (Tabela 10). Foram obtidas plântulas mais vigorosas, uma vez que esses apresentaram os maiores valores de IVE, que diferiram significativamente com os isolados F1, F4 e a Testemunha. Nakagawa (1999) relata que a uniformidade e a rapidez de emergência de plântulas são importantes parâmetros para avaliar o vigor de sementes e, Nakagawa (1994) reforça que existe uma relação direta entre o IVE e o vigor das sementes.

Tabela 10 - Índice de velocidade de emergência (IVE), após inoculação de isolados de *Fusarium* sp. em sementes de *Cordia americana* coletadas na planta e solo.

Isolado	Índice de velocidade de emergência (IVE)
F1	0,518 a
F2	0,408 b
F3	0,498 a
F4	0,372 b
Testemunha	0,385 b
Média (%)	0,436
CV (%)	25,41

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

O fato de a testemunha apresentar valores baixos de IVE pode ser explicado pela baixa qualidade das sementes utilizada no experimento para esse tratamento, conforme já foi verificado anteriormente, onde ocorreu baixo percentual de plântulas normais, alto número de SNG e tombamento em pré-emergência.

9.3 Massa verde e comprimento de plântulas

Em relação aos resultados obtidos na variável massa verde de plântulas, observou-se interação significativa entre as sementes obtidas de diferentes métodos de coleta e os diferentes isolados de *Fusarium* sp. (Tabela 11). Constatou-se que ao inocular as sementes com os isolados F3 e F4, o efeito destes foi significativo entre as duas proveniências de sementes. Quando utilizado sementes coletadas na planta, para o isolado F3, verificaram-se valores médios superiores e significativos de massa verde (0,059 g) em relação aos valores das sementes coletadas do solo (0,047 g). Resultados semelhantes foram observados para o isolado F4, sendo que sementes da planta inoculadas com o fungo produziram valores médios de 0,062 gramas de massa verde e sementes do solo produziram 0,046 gramas para essa variável. Esses resultados podem ser atribuídos a melhor qualidade das sementes coletadas na copa, uma vez que produziram maior massa verde, indicando plântulas

mais vigorosas. De acordo com as especificações da AOSA (1983), a massa de matéria verde é um dos índices que servem como parâmetro para indicar o vigor, sendo que amostras de sementes que originam plântulas com maior massa de matéria verde, são consideradas mais vigorosas.

Quando observados os resultados obtidos apenas para o fator método de coleta no solo, foi possível verificar que o efeito dos isolados inoculados nas sementes produziram valores médios inferiores de massa verde de plântulas (sem diferenças entre si) em relação à testemunha, em que não foi inoculado o patógeno (Tabela 11). Esses resultados se devem, provavelmente, a interferência de *Fusarium* sp. no desenvolvimento das plântulas. Menten (1991) ressalta que os patógenos associados às sementes podem promover, além da redução da população de plântulas, a debilitação das mesmas. Santos et al. (2000) relatam que alguns patógenos infectam a plântula sistemicamente, reduzindo seu vigor e só manifestando sintomas mais tarde.

Tabela 11 - Valores médios de massa verde de plântulas (g), após inoculação de isolados de *Fusarium* sp. em sementes de *Cordia americana* coletadas na planta e solo.

Isolado	Método		Média (g)
	Solo	Planta	
F1	0,042 b A	0,043 b A	0,042
F2	0,041 b A	0,038 b A	0,039
F3	0,047 b B	0,059 a A	0,053
F4	0,046 b B	0,062 a A	0,054
Testemunha	0,066 a A	0,058 a A	0,062
Média (g)	0,048	0,052	0,049
CV (%)	15,27		

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. C.V.(%) = coeficiente de variação.

O efeito dos tratamentos sobre a massa verde de plântulas apresentou efeito significativo quando analisado o método de coleta na planta. Os isolados F1 e F2 apresentaram valores médios inferiores para essa variável (sem diferenças significativas entre si), diferindo significativamente dos isolados F3 e F4 e da

testemunha, que também não apresentaram diferenças significativas entre si. Esses resultados mostram que esses isolados são mais virulentos, uma vez que produziram menor desenvolvimento das plântulas.

Em relação aos resultados de comprimento de plântulas, não houve interação entre os fatores testados, indicando que a inoculação com isolados de *Fusarium* sp. nas sementes, provenientes da copa e do solo, não teve efeito sobre essa variável. No entanto, quando avaliado o método de coleta, foram observados valores médios superiores de comprimento de plântulas nas sementes coletadas na copa (5,86 cm), em relação às sementes coletadas no solo (5,78 cm).

O efeito dos isolados sobre o método de coleta também não produziu diferenças significativas. Porém, constatou-se maior comprimento médio de plântulas na testemunha (5,95 cm), sendo que os outros tratamentos em que foi inoculado o patógeno as plântulas apresentaram menor comprimento. Em um estudo de avaliação da qualidade fisiológica em sementes de pepino, Menezes et al. (2011) verificaram médias inferiores de comprimento de raiz em plântulas, após inoculações com *Fusarium verticillioides*. Segundo Nakagawa (1999) o comprimento de plântulas é um parâmetro indicado para mensurar diferenças de vigor em plântulas, podendo-se considerar que amostras com maiores valores médios são as mais vigorosas.

9.4 Caracterização dos isolados

9.4.1 *Fusarium acuminatum* Ellis & Everhart

9.4.1.1 Caracterização morfológica

Nesse trabalho, o isolado F1 foi alocado na seção Gibbosum, sendo classificado de acordo com a chave de classificação de Nelson et al. (1983) e identificado como *Fusarium acuminatum*. Nessa seção, também são alocadas as seguintes espécies: *F. equiseti*, *F. scirpi* e *F. longipes*.

Na tabela 12 e figura 7 é possível observar as características morfológicas de *Fusarium acuminatum*. A cultura em meio BDA apresentou a formação de micélio aéreo de coloração branca, flocosa com pigmentação rosa. Na superfície inferior da cultura foi observada coloração vermelho carmim, variando com tons de bronzeado ao marrom (Figura 7).

Em meio Folha de Cravo-Ágar (CLA) foram observadas as características das estruturas, concordando com as informações descritas por Leslie e Summerell (2006), além das descrições de Nelson et al. (1983). Os macroconídios, formados em esporodóquio de coloração laranja pálido ao marrom escuro (Figura 8A), apresentaram a forma delgada e fortemente curvada ($35,7 \times 5,0 \mu\text{m}$) em forma de foice e com uma média de três septos. A célula basal apresentou forma distinta e a célula apical formato alongado, enfatizando a curvatura do esporo (Figura 8B). A presença de microconídios foi observada de forma rara.

Além dessas características foi constatada a presença de clamidósporos ocorrendo de forma isolada, em cadeia ou em aglomerados (Figura 8C). De acordo com Nelson et al. (1983), a presença de clamidósporo em *Fusarium acuminatum* é uma característica importante na distinção de *F. graminearum*, pois as duas espécies apresentam semelhança na forma dos macroconídios.

Tabela 12 - Características morfológicas de *Fusarium acuminatum* isolado a partir de sementes de *Cordia americana*.

Características morfológicas	
Pigmentação da cultura ¹	vermelho carmim/bronzeado ao marrom
Tamanho de macroconídio ²	$35,7 \times 5,0 \mu\text{m}$
Número médio de septos ²	3 (três)
Esporodóquio ²	Presente/cor laranja pálido a marrom escuro
Microconídios ²	Presentes/esparsos
Clamidósporo ²	Presente/isolados, em cadeia ou aglomerado
Conidióforo ²	Presente/monofialide

¹ Meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas; ² Meio de cultura folha de cravo-ágar (CLA), $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

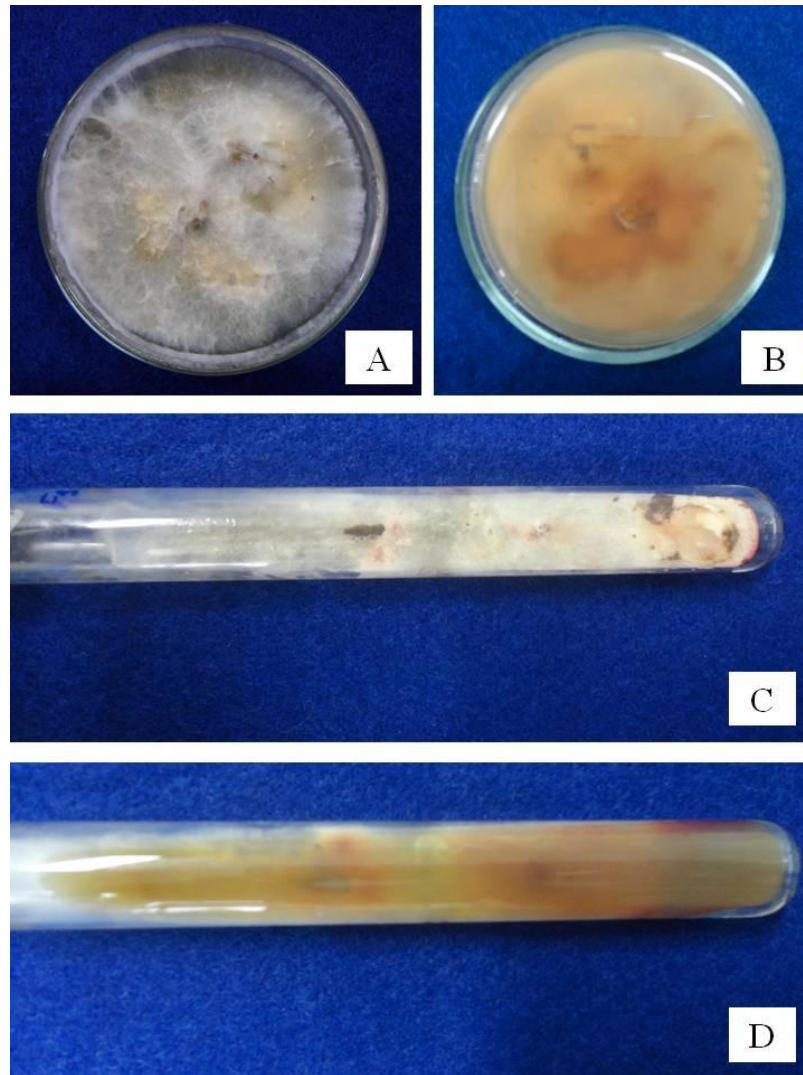


Figura 6 - Características das culturas de *Fusarium acuminatum* em meio BDA. Vista superior na placa de Petri (A); vista inferior na placa de Petri (B); vista superior no tubo de ensaio (C); vista inferior no tubo de ensaio (D).

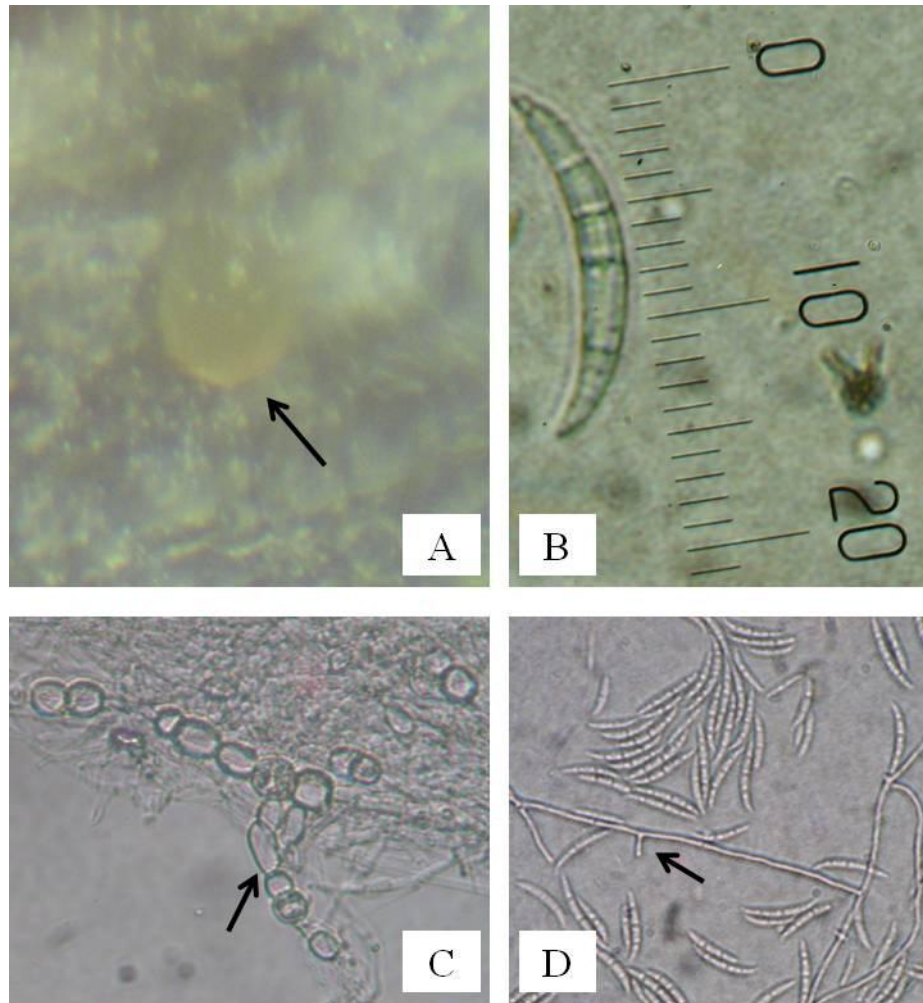


Figura 7 - Características morfológicas da cultura de *Fusarium acuminatum* em meio folha-de-cravo (CLA) vista em microscópio óptico com aumento de 40 x. Esporódóquio (A); medida microscópica de macroconídio (B); clamidósporos (C); conidióforo em monofiálide (D).

Os resultados referentes ao diâmetro da colônia (DC) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) estão apresentados na figura 9. Verificou-se que o fungo *F. acuminatum* apresentou relação quadrática entre o diâmetro da colônia e o tempo durante a avaliação (144 horas), atingindo 9 cm no final desse período. Observou-se que o crescimento da colônia foi cerca de 1,60 cm a cada 24 horas, diminuindo a velocidade a partir das 96 horas. Em relação ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), os dados ajustaram-se a um modelo quadrático, sendo que o máximo valor (0,84 cm) foi atingido 48 horas após a incubação.

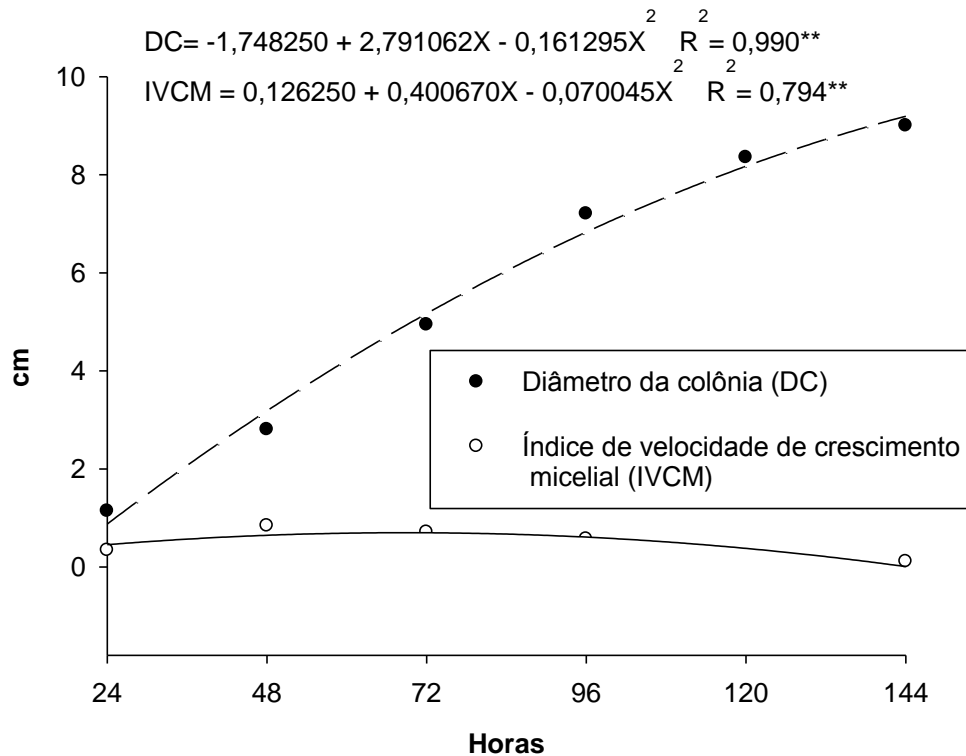


Figura 8 - Análise de regressão para diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial de *Fusarium acuminatum* em meio BDA, incubado a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

9.4.1.2 Caracterização molecular

Através da amplificação da região ITS por PCR, sequenciamento e comparação com sequências depositadas no *Genbank*, foi construído o dendrograma filogenético para essa região (Figura 10). Na tabela 13 estão apresentados os acessos no *Genbank* com seu respectivo número, percentual de cobertura e similaridade. Esses acessos foram utilizados para construção do dendrograma, sendo escolhidos os que apresentaram maior similaridade e cobertura da sequência, obtidos após o alinhamento.

Tabela 13 - Acesso no Genbank, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS.

Espécie	Acesso no Genbank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Fusarium acuminatum</i>	AB587001	100	100	Watanabe et al. (2010)
<i>Fusarium armeniacum</i>	GU205408	100	100	Jimenez-Fernandez et al. (2011)
<i>Fusarium langsethiae</i>	AB587022	100	99	Watanabe et al. (2011)
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	HM037924	100	99	Wu & Song (2010)
<i>Fusarium pulverosum</i>	AF414969	100	99	Yli-Mattila et al. (2004)
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AF414972	100	99	Yli-Mattila et al. (2004)
<i>Fusarium langsethiae</i>	AB587021	99	99	Watanabe et al. (2011)
<i>Fusarium acuminatum</i>	AB587002	100	99	Watanabe et al. (2011)
<i>Fusarium armeniacum</i>	GQ505462	100	99	O'Donnell et al. (2009)
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	JF739304	100	97	Guo et al. (2011)
<i>Fusarium kyushuense</i>	AF414971	100	97	Yli-Mattila et al. (2004)
<i>Fusarium armeniacum</i>	GQ505462	100	99	O'Donnell et al. (2009)
<i>Gibberella acuminata</i>	U85533	97	100	O'Donnell (1997)

O dendrograma resultante do agrupamento dos dados do isolado F1 se apresenta na figura 10. Observa-se que o isolado F1 foi alocado no mesmo grupo que as espécies *Fusarium acuminatum* (AB587001), *Fusarium armeniacum* (GU205408) e *Gibberella acuminata* (U85533). De acordo com Leslie e Summerell (2006), *F. armeniacum* é uma subespécie de *F. acuminatum* e *G. acuminata* é a fase sexuada de *F. acuminatum*.

De acordo com a tabela 13, *F. acuminatum* (AB587001) e *F. armeniacum* (GU205408) apresentaram 100% de cobertura e similaridade, enquanto que *G. acuminata* (U85533) obteve valores de 97 e 100% de cobertura e similaridade, respectivamente. Nesse grupo, o suporte de *bootstrap* foi de 95% (Figura 10), indicando que houve pouco desvio entre os dados originais da matriz de similaridade e os dados utilizados para a construção do dendrograma, o que explica adequadamente os dados biológicos. Os resultados indicam, portanto, que o isolado F1 dentro desse *clade* (ramo) foi geneticamente mais próximo dessas espécies do que entre isolados de outros ramos.

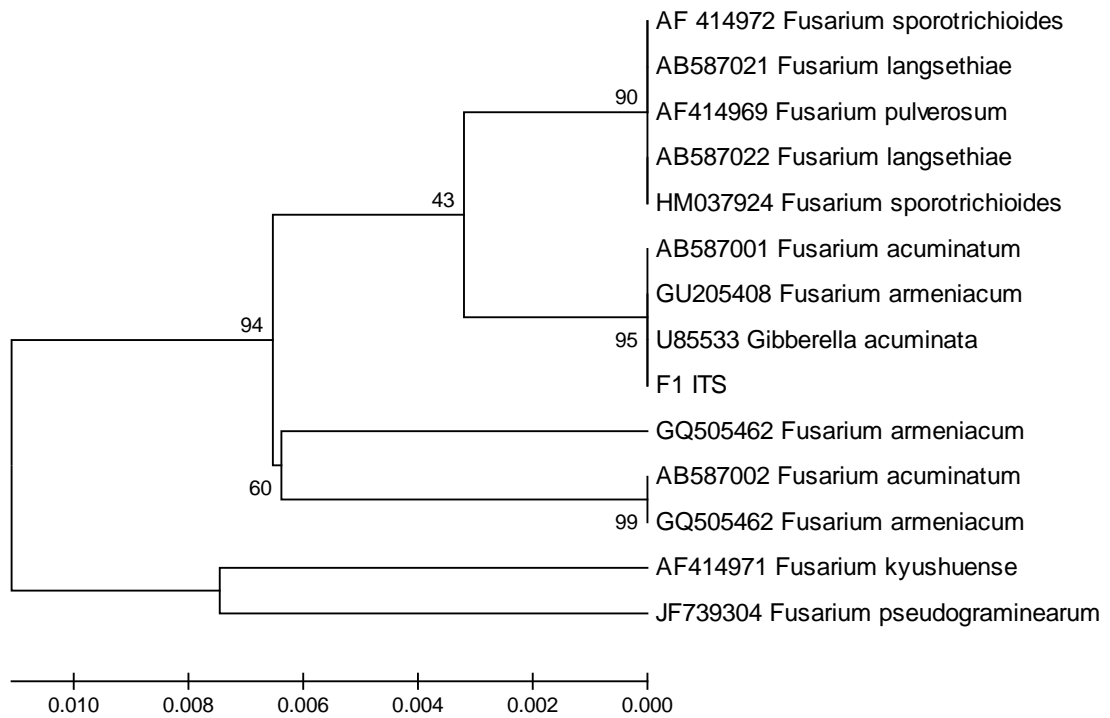


Figura 9 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).

Com o sequenciamento da região do fator de alongação 1- α foi obtido altos valores de cobertura e similaridade, que aumentam a confiabilidade do alinhamento, conforme pode ser observado na tabela 14.

Tabela 14 - Acesso no Genbank, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α .

Espécie	Acesso no Genbank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Fusarium acuminatum</i>	AB674280	97	98	Watanabe et al. (2012)
<i>Fusarium armeniacum</i>	GU116572	97	98	Funnell-Harris et al. (2010)
<i>Fusarium armeniacum</i>	GQ915501	95	98	Proctor et al. (2009)
<i>Fusarium armeniacum</i>	HM744659	94	98	Yli-Mattila et al. (2011)
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	JF740876	99	92	O'Donnell et al. (2012)
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	JF740808	99	92	O'Donnell et al. (2012) Funnell-Harris & Pedersen (2012)
<i>Gibberella zeae</i>	JF270274	97	89	
<i>Fusarium langsethiae</i>	JN107806	98	91	Dal Pra et al. (2012)
<i>Fusarium langsethiae</i>	EU744847	97	91	Stenglein et al. (2010)
<i>Fusarium equiseti</i>	DQ842060	84	92	Punja et al. (2007)

Na construção da árvore filogenética (Figura 11) verificou-se que o isolado F1 foi alocado no mesmo *clade* que as espécies: *F. acuminatum* (AB674280), *F. armeniacum* (GU116572), *F. armeniacum* (GQ915501) e *F. armeniacum* (HM744659). O suporte de *bootstrap* foi de 100%, indicando que não houve desvio entre os dados originais da matriz de similaridade e os dados utilizados para a construção do dendrograma. Portanto, de acordo com o sequenciamento da região ITS e fator de alongação 1- α , pode-se concluir a identificação molecular, pois os resultados corroboram com a análise morfológica, na qual o isolado foi identificado como *Fusarium acuminatum*.

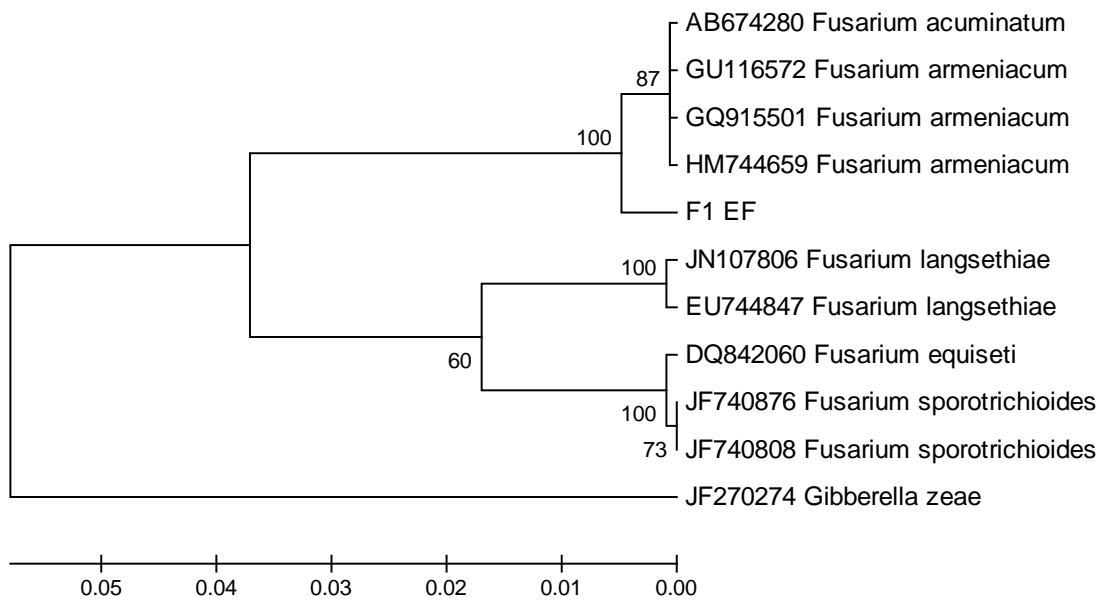


Figura 10 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α . Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).

9.4.2 *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (G) (Syn: *F. moniliforme*)

9.4.2.1 Caracterização morfológica

Existe uma controvérsia em relação ao nome com que alguns taxonomistas denominam *F. moniliforme* e outros *F. verticillioides*. O nome *F. verticillioides* tem prioridade e é atualmente aceito como a denominação que deve ser utilizada para essa espécie. Além disso, *F. verticillioides* deve ser utilizado apenas para cepas que tem *Giberella moniliformis* como seu teleomorfo e não apenas como uma substituição ao nome *F. moniliforme* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Nesse estudo, os isolados F2, F3 e F4 foram identificados como *F. verticillioides*, sendo alocado na seção Liseola (NELSON et al., 1983). De acordo com o mesmo autor, nessa seção estão alocadas também as seguintes espécies: *F. proliferatum*, *F. subglutinans* e *F. anthrophilum*.

Fusarium verticillioides, em meio de cultura BDA, desenvolveu micélio aéreo de coloração branca, porém ao longo do crescimento foi observada uma pigmentação de coloração violeta, corroborando com a descrição de Leslie e Summerell (2006). Em relação à coloração da cultura na superfície inferior da placa, observou-se tons de laranja acinzentada a violeta com tons de cinza, ocorrendo também alguns tons de violeta escuro (Figura 12).

Os macroconídios (Tabela 15 e Figura 13B), em meio CLA apresentaram a forma falcada (acanoada) ou reta com paredes finas, a célula basal em forma de pé e a célula apical relativamente alongada, tamanho médio dos macroconídios de 43,8 x 2,8 µm com quatro septos, de acordo com as descrições de Leslie e Summerell (2006), além de Nelson et al. (1983).

Os microconídios são formados em monofiálides e dispostos em cadeias (Figura 13D), ocasionalmente produzidas em pares com aparência de “orelha de coelho”. Essa característica distingue *F. verticillioides* de *F. proliferatum*, pois o último possui a capacidade de formar cadeias de microconídios em polifiálides. *F. verticillioides* não forma clamidósporos, característica importante para distinguir de *F. nygamai* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Tabela 15 - Características morfológicas de *Fusarium verticillioides* isolado a partir de sementes de *Cordia americana*.

		Características morfológicas
Pigmentação da cultura ¹		laranja acinzentada a violeta com tons de cinza, violeta escuro
Tamanho de macroconídio ²		43,8 x 2,8 µm
Número médio de septos ²		4 (quatro)
Esporodóquio ²		Presente/bronzeado ao laranja
Microconídios ²		Presentes/abundantes
Clamidósporo ²		Ausente
Conidióforo ²		Presente, em monofiálides ramificadas e não-ramificadas

¹ Meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas; ² Meio de cultura folha de cravo-ágar (CLA), 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

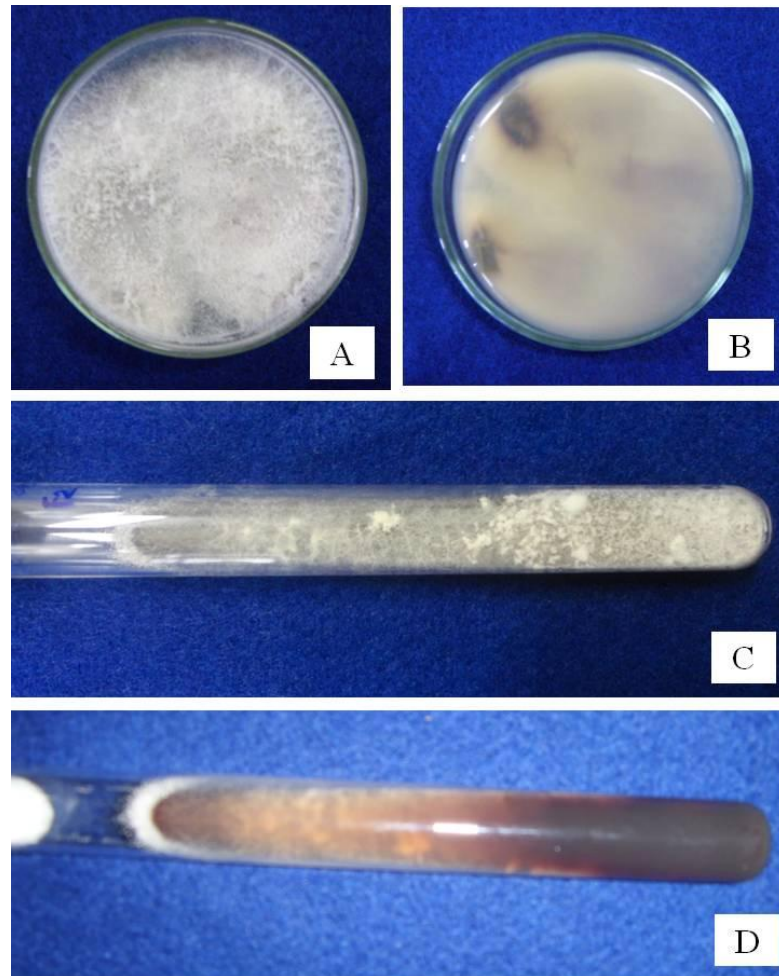


Figura 11 - Características da cultura de *Fusarium verticillioides* em meio BDA. Vista superior na placa de Petri (A); vista inferior na placa de Petri (B); vista superior no tubo de ensaio (C); vista inferior no tubo de ensaio (D).

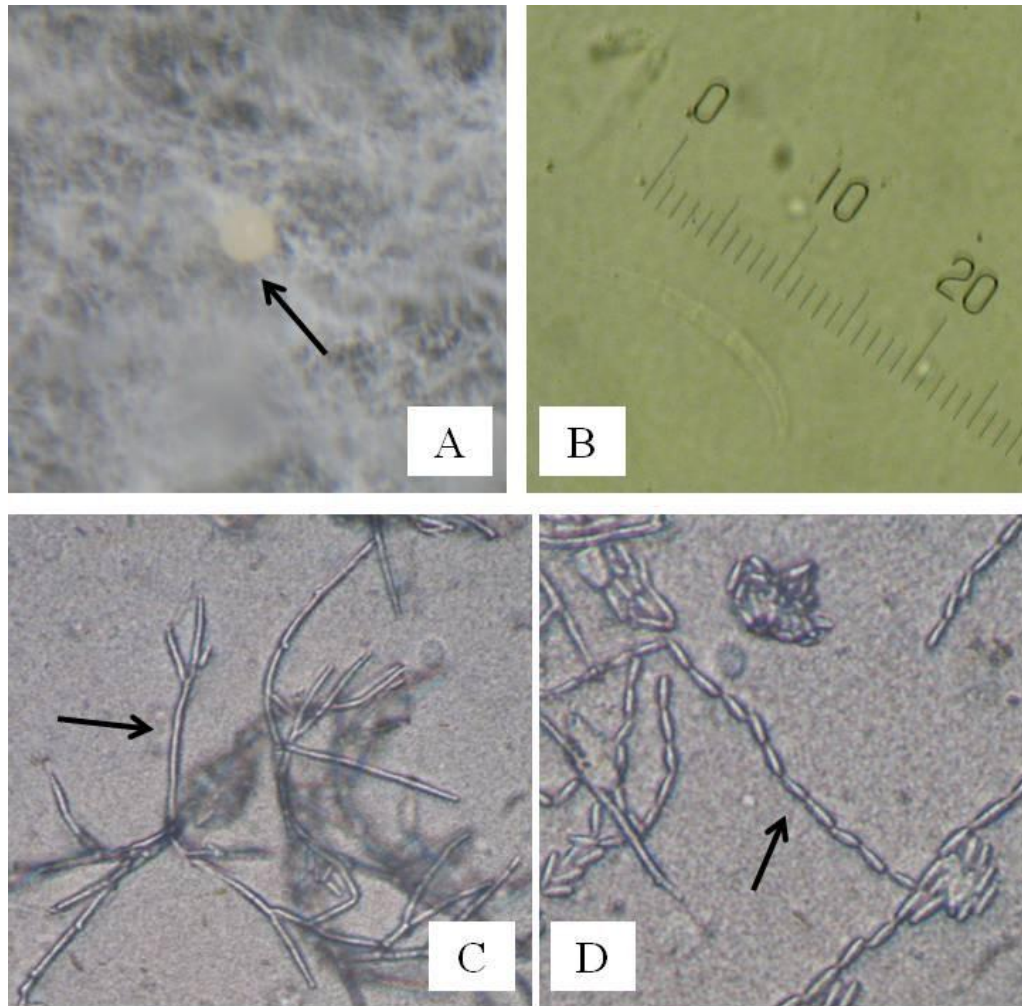


Figura 12 - Características morfológicas da cultura de *Fusarium verticillioides* em meio folha-de-cravo (CLA) vista em microscópio óptico com aumento de 40 x. Esporodóquio (A); medida microscópica de macroconídio (B); conidióforo em monofiálide (C); Microconídios em cadeias (D).

Fusarium verticillioides apresentou relação quadrática entre o diâmetro da colônia e o tempo de avaliação de 192 horas, ocupando toda a placa (9 cm) no final desse período (Figura 14). Se comparado ao crescimento do fungo *F. acuminatum*, é possível afirmar que *F. verticillioides* apresentou crescimento mais lento em relação a essa espécie (aproximadamente 1,12 cm a cada 24 horas).

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) ajustou-se também ao modelo quadrático, atingindo o máximo valor (0,77 cm) no tempo de 48 horas após a instalação do experimento. Aos 120 dias, esse índice passou a diminuir até atingir o valor mínimo de 0,03 cm no tempo de 192 horas.

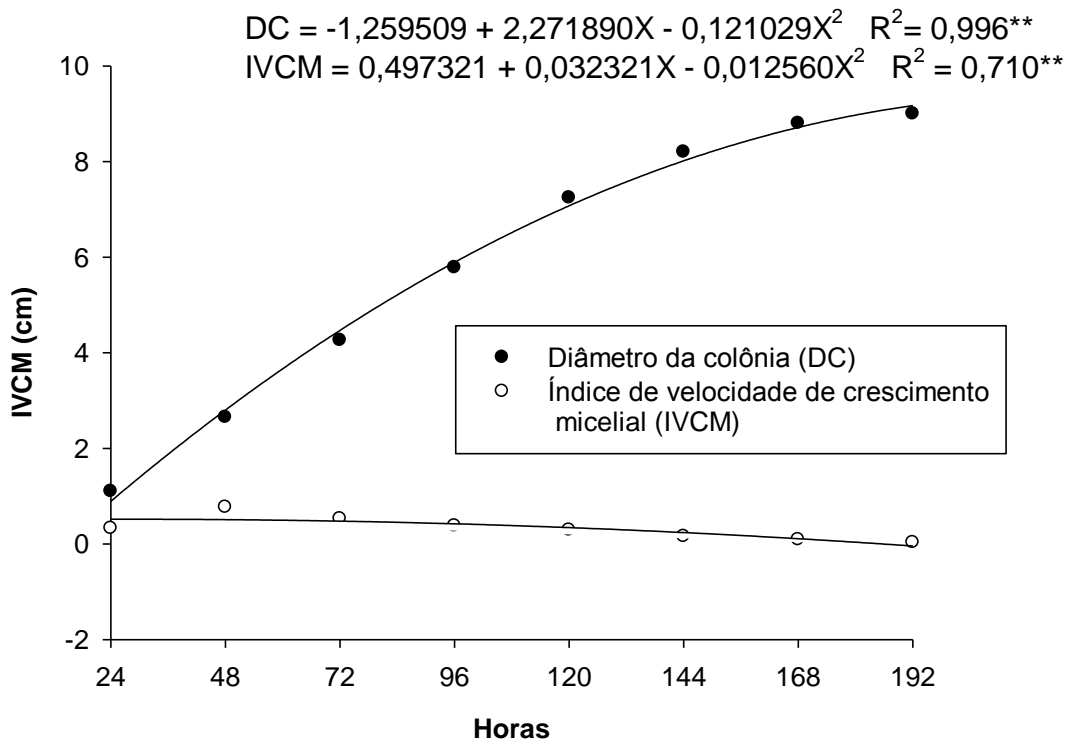


Figura 13 - Análise de regressão para diâmetro da colônia (DC) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Fusarium verticillioides* em meio BDA, incubado a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

9.4.2.2 Caracterização molecular

Para a confecção da árvore filogenética dos isolados F2, F3 e F4 através da amplificação da região ITS foram utilizados os acessos no *Genbank*, que podem ser observados na tabela 16 com seu respectivo número, percentual de cobertura e similaridade. Verificou-se que todos os acessos tiveram 100% de cobertura e similaridade.

Tabela 16 - Acesso no Genbank, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS.

Espécie	Acesso no Genbank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Gibberella moniliformis</i>	JQ014691	100	100	Guillen-Jimenez et al. (2012)
<i>Gibberella moniliformis</i>	HQ995667	100	100	Bashyal e Aggarwal(2012)
<i>Fusarium subglutinans</i>	AB587008	100	100	Watanabe et al. (2011)
<i>Gibberella moniliformis</i>	HQ718417	100	100	Lu et al. (2011)
<i>Fusarium subglutinans</i>	GU205425	100	100	Jimenez-Fernandez et al. (2011)
<i>Gibberella moniliformis</i>	HQ995667	100	100	Bashyal e Aggarwal(2012)
<i>Gibberella moniliformis</i>	JN088235	100	100	Zhou e Song(2011)
<i>Fusarium proliferatum</i>	EU821492	100	100	Lopera et al. (2009)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	AY898250	100	100	Liu e Wang(2005)
<i>Gibberella moniliformis</i>	GU480956	100	100	Malpica-Gutierrez et al. (2010)
<i>Fusarium proliferatum</i>	EU821478	100	100	Lopera et al. (2009)
<i>Gibberella moniliformis</i>	AY898257	100	100	Liu e Wang (2005)
<i>Fusarium subglutinans</i>	AY898251	100	100	Liu e Wang (2005)
<i>Fusarium acutatum</i>	AY213653	-	-	Rakeman et al. (2007)
<i>Fusarium acutatum</i>	AY569567	-	-	Taj-Aldeen et al. (2006)

As espécies *F. acutatum* (AY213653) e *F. acutatum* (AY569567) foram incluídas na análise como um *outgroup* (Figura 15). Verificou-se que todos os isolados (F2, F3 e F4) foram alocados no mesmo grupo, composto pela fase sexuada de *F. verticillioides* (*Gibberella moniliformis* ou *Gibberella fujikuroi*), apresentando suporte de *bootstrap* de 99%. Além dessas espécies, agruparam-se também, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, que pertencem a mesma seção que *F. verticillioides* (seção *Liseola*) e, portanto, apresentam características morfológicas semelhantes. De acordo com Silva et al. (2006), a conservação de locus em *F. verticillioides* e *F. subglutinans* mostra duas espécies intimamente relacionadas, apresentando o mesmo haplotipo e conformando um mesmo clado. Querales (2010) verificou que isolados de *F. subglutinans* encontraram-se no dendrograma a uma

distância genética menor de *F. verticillioides* se comparado com a distância de *F. proliferatum*.

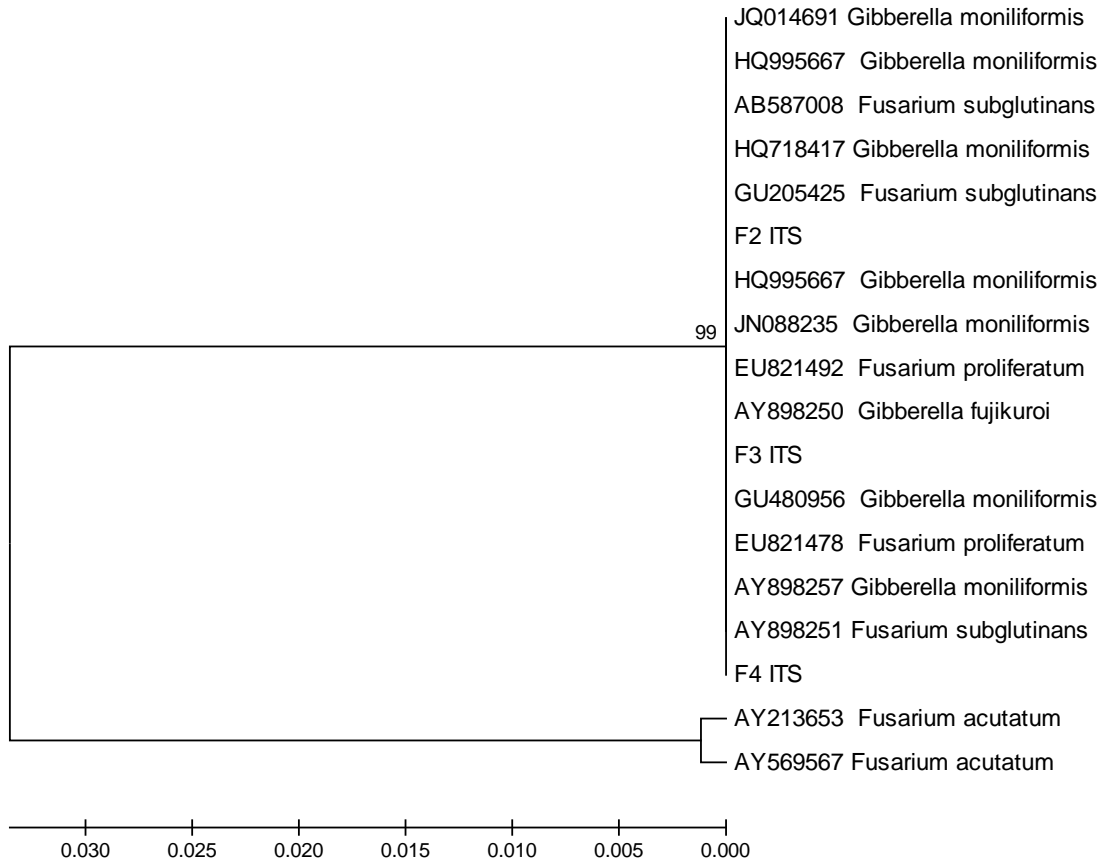


Figura 14 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).

Através do sequenciamento da região do fator de alongação 1- α , e comparação com sequências depositadas no *Genbank* (Tabela 17) foi possível a construção da árvore filogenética. Através da figura 16 verifica-se que os isolados (F2, F3 e F4) se aproximaram em um grande grupo, apresentando valores de *bootstrap* confiáveis (92%). Verifica-se que todos os isolados formaram grupos menores, sendo que os mesmos se alocaram no grupo da fase sexuada de *Fusarium verticillioides*, sendo a mesma denominada *Gibberella moniliformis* Wineland, segundo Leslie e Summerell (2006) ou *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw (NELSON et al., 1983). O isolado F4 se agrupou com *F. verticillioides*

(FN179338) e *F. verticillioides* (FN179343), sendo que ambos apresentaram altos valores de cobertura (96%) e similaridade (99%).

Tabela 17 - Acesso no Genbank, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α .

Espécie	Acesso no Genbank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Gibberella moniliformis</i>	JF740739	100	99	O'Donnell et al.(2012)
<i>Fusarium verticillioides</i>	FN179338	96	99	Wulff et al. (2010)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	AM422693	95	99	Jurado et al. (2007) Van Hove et al. (2011)
<i>Fusarium musae</i>	FN552085	97	98	
<i>Gibberella moniliformis</i>	JF740737	100	99	O'Donnell et al.(2012)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	AM422692	95	99	Jurado et al. (2007) Van Hove et al. (2011)
<i>Fusarium musae</i>	FN552086	97	99	
<i>Gibberella moniliformis</i>	AB674287	97	99	Watanabe et al. (2012)
<i>Fusarium verticillioides</i>	FN179343	96	99	Wulff et al. (2010)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	AM422699	95	100	Jurado et al. (2007)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	AM404149	95	99	Jurado et al. (2007)
<i>Fusarium acutatum</i>	AF160276	-	-	O'Donnell (2005)
<i>Fusarium acutatum</i>	HM347129	-	-	O'Donnell et al.(2011)

Dessa maneira, através do sequenciamento das regiões ITS e fator de alongação 1- α , pode-se concluir a identificação molecular através da análise dos dendrogramas filogenéticos e confronto com a análise morfológica. Portanto, verificou-se que os isolados F2, F3 e F4 apresentam proximidade genética e foram identificados como *Fusarium verticillioides*.

10 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos, podem-se chegar as seguintes conclusões:

- Dos isolados obtidos de sementes de *Cordia americana* foram identificados *Fusarium acuminatum* em um isolado e, *Fusarium verticillioides* em três isolados;
- *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* são patogênicos à *Cordia americana*, causando tombamento em pré e pós-emergência, com apodrecimento das raízes e necrose do hipocótilo, seguida de ruptura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda há muito que se verificar nas literaturas científicas a respeito das tecnologias de sementes capazes de fornecer embasamento para confecção de futuros manuscritos. No presente estudo, devido ao reduzido número de coletas de sementes na copa, ocasionado pela rápida dispersão de sementes da espécie *Cordia americana*, não foi possível determinar o ponto de maturidade fisiológica. Assim, torna-se necessário gerar outras informações sobre a espécie, bem como, metodologias para a determinação da maturidade fisiológica das sementes e aplicação dos testes de vigor. Além disso, a fim de definir estratégias de coleta de sementes são fundamentais outros estudos mais detalhados sobre incidência de fungos durante a maturação fisiológica e após a dispersão no solo.

Neste estudo, a identificação de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* associado às sementes e patogênicos a espécie *Cordia americana* é fundamental para a condução de estratégias de controle do patógeno. Assim, são importantes estudos relacionados às medidas de controle de patógenos em sementes, através de metodologias eficientes de assepsia e/ou utilização de microrganismos de biocontrole como *Trichoderma* e, a utilização desses agentes incorporados no substrato utilizado na produção de mudas. Entretanto, são necessários estudos *in vivo* para que se comprovem a sua real eficiência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIMI, S. C. et al.; ARAUJO, M. M.; CUNHA, F. S.; LAUTENCHLEGER, A. M.; MARIO, G. C. Germinação de sementes de *Cordia americana* (L.) Gottshling & J.E.Mill. In: 26º JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA, 2011, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2011, 1CD-ROM.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

ALVES, E. U. et al. Maturação fisiológica de sementes de sabiá. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 2, n. 1, p. 01-08, 2005.

ANDREIS, C. et al., Estudo fenológico em três fases sucessionais de uma floresta estacional decidual no município de Santa Tereza, RS, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 1, jan./feb. 2005.

ARAUJO, A. V. et al. 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 Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigour testing handbook**. East Lasing, 1983. 88p. (To the Handbook on Seed Testing. Contribution, 32).

ATHAYDE, E. A. et al. Fenologia de espécies arbóreas em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre-RS, v. 7, n. 1, p. 43-51, jan./mar. 2009.

ÁVILA, A. L. et al. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (pitanga), Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 1, p. 61-68, 2009.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustred genera of imperfect fungi**. 3 Ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 241 p.

BRAGA JÚNIOR, J. M. **Maturação, qualidade fisiológica e testes de vigor em sementes de mamona**. 2009. 118f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 399 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. FUNEP. Jaboticabal, 588 p., 2000.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica. Colombo, PR: EMBRAPA Florestas, v. 1, 2003. 1039 p.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 51-68, 2004.

CORVELLO, W. B. V.; VILLELA, F. A.; NEDEL, J. L.; PESKE, S. T. Maturação fisiológica de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 23-27, 1999.

DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. Sementes Florestais. In: DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. 1. ed. Lavras: UFLA, 2008. Cap. 1, p. 11-82. 174 p.

DHINGRA, O. D. et al. Seedborne pathogenic fungi affect seedling quality of red angico (*Anadenanthera macrocarpa*) trees in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 150, p. 451-455, 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S.l.], v. 12, p. 13-15, 1991.

FAIAD, M. G. R.; RAMOS, V. R.; WETZEL, M. M. V. Patologia de espécies florestais do cerrado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa. **Palestras e Resumos**: João Pessoa, 2004. p. 36-42.

FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT. 1993. 128 p.

FERRERA, T. S. **Fenologia de espécies arbóreas nativas no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS**. 2012. 104f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria – RS, 2012.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.

FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. Lavras: Ufla, 2ª ed. Ampliada e revisada; 2009. 664p.

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

FIGLIOLIA, M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook et Arn em floresta ripária do rio Moji Guaçu, Município de Moji Guaçu, SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 6, p. 13-52, 1994.

FIGLIOLIA, M. B. Colheita de sementes. In: SILVA, A.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1995. p. 1-12. (Série Registros, 14).

FIGLIOLIA, M. B. et al. Controle de qualidade de sementes florestais: propostas de parâmetros técnicos. . In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. **Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais**. Seropédica: EDUR/UFRRJ, 2007. Cap. 5, p. 143- 188.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus Fusarium – a pictorial atlas**. Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land – und. Forstwirtschaft. 1982, 406 p.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [S.l.], v. 41, n. 41 p. 95-98. 1999.

HERMOSA, M. R. et al. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1890-1898. 2000.

KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, v. 24, p. 1481-1485. 2002.

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

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. 1 ed. Blackwell Publishing: USA. 2006, 388 p.

LIMA JUNIOR, M. J. V. (Ed.). **Manual de procedimentos para análise de sementes florestais**. Manaus: UFAM, 2010. 146 p.

LORENZI, H. et al. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. São Paulo: Nova Odessa/Instituto Plantarum, 2008. 384 p.

MACEDO, A. C.; KAGEYAMA, P. Y.; COSTA, L. G. S. Produção de mudas em viveiros florestais. **Revista da Madeira**, Curitiba, edição especial, 2004, p. 48-58.

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

MACHON, P. et al. Influence of ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* on pre-emergence, post-emergence and late damping-off by *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* on Stone pine seedlings. **Symbiosis**, 49: 101-109. 2009.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 2012.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARQUES, M. A. et al. Efeito do número de sementes e do volume de água na condutividade elétrica de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All. ex Benth. **Revista Brasileira de sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, 2002.

MARTÍN-PINTO, P., J. PAJARES; J. DÍEZ. Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* seedlings in northwest Spain. **Forest Path.** 38(2):78-82. 2008.

MEDEIROS, C. S.; CHODOR, J.; BULGACOV, A. **Coleta de sementes em árvores altas** [recurso eletrônico] – Dados eletrônicos. - Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

MENEZES, V. O. et al. Detecção e influência de *Fusarium* spp. na qualidade fisiológica de sementes de pepino. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 193-199, fev. 2011.

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

MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. 312p.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, 1994. p.49-86.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2, p. 1-24. 218p.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium Species**: an Illustrated Manual for Identification. Philadelphia: Pennsylvania State University Press. 1983. 193 p.

NETO, S. N. O.; SILVA, J. A. Áreas protegidas e a produção de sementes florestais sob o ponto de vista legal. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. **Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais**. Seropédica: EDUR/UFRRJ, 2007. Cap. 2, p. 35-48.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 1991.

OLIVEIRA, O. S. **Tecnologia de sementes florestais**. Curitiba: Imprensa Universitária, 2007. 185 p.

PADULLA, T. L. et al. Detecção de fungos em sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) coletadas durante sua formação e dispersão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 154-159, 2010.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; AGUIAR, I. B. Maturação e dispersão de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. & FIGLIOLIA, M. B. (ed.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p.215-274.

PINÃ-RODRIGUES, F. C. M. **Guia prático para colheita e manejo de sementes florestais tropicais**. Rio de Janeiro: IDACO, 2002. 40 p.

PINÃ-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: Gui Ferreira, A.; Borghetti, F. **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 284-297.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. Estado da arte da pesquisa em tecnologia de sementes de espécies florestais da Mata Atlântica. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. **Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais**. Seropédica: Edur, 2007. Cap. 4, p. 105-141.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. Estado da arte da produção de sementes de espécies florestais na Mata Atlântica. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. **Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais**. Seropédica: EDUR/UFRRJ, 2007. Cap. 1, p. 11-33.

POLETTI, I. et al. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores de podridão-de-raízes aa erva-mate. **FLORESTA**, Curitiba: v. 42, n. 1, p. 95 - 104, jan./mar. 2012.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985, 2ª. Ed. 289 p.

QUERALES, P. J. **Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolado de sementes e associados a podridão do colmo do milho (*Zea mays* L.)**. 2010, 81 f. Tese (Doutorado em Ciências – Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo – SP, 2010.

REHNER, S. A., BUCKLEY, E. A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, [S.l.], v. 97, n. x, p. 84–98, 2005.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, 1988. 525 p.

SA, D. A. C. de. et al. Transporte, patogenicidade e transmissibilidade de fungos associados às sementes de pinhão manso. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 663-670, 2011.

SANTOS, A. F. dos., GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**, Curitiba: v. 30, n. 1/2, p. 119-128, 2000.

SILVA, L. D.; HIGA, A. R. Planejamento e implantação de pomares de sementes de espécies florestais nativas. In: SILVA, L. D.; HIGA, A. R. **Pomar de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF. p. 13-40. 2006.

SILVA, V. N. et al. Characterization and genetic variability of *F. verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 52, p. 798-804, 2006.

STEIRNAGEL, E. L. et al. **Avaliação da germinação de sementes de *Cordia americana* (L.) Gottshling & J.E.Mill. em diferentes substratos**, II Congresso Brasileiro de Reflorestamento Ambiental., Guarapari: Sesc. CD-Rom, 2012.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. Na utilitarian approach o *Fusarium* identification. **Plant disease**, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 596-1599, 2007.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, M. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M.; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 31-47.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, Beneficiamento e Armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação** – do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 17, p.266-281.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, v. 11, n. 3, p. 513- 522, 1994.

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

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. Cap. 1, p. 23-51.