

MÉTODOS DE DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp. EM SEMENTES DE *Pinus taeda*

DETECTION METHODS, TRANSMISSION AND PATHOGENICITY OF *Fusarium* spp IN *Pinus taeda* SEEDS

Thaís Wendhausen Ramos da Silva¹ Álvaro Figueredo dos Santos² Celso Garcia Auer³
Dauri José Tessmann⁴

RESUMO

Apodridão-de-raiz (PR), causada por *Fusarium* spp., ocasiona perdas de plântulas no viveiro que apresentam, inicialmente, descoloração das acículas para tom verde-amarelado seguida de curvatura apical, murcha e consequente morte da muda. Os objetivos deste trabalho foram: a) determinar o método adequado e eficiente para detecção de *Fusarium* spp. nas sementes de *Pinus taeda*; b) verificar se há transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas de *Pinus taeda*; c) desenvolver uma escala descritiva para avaliar a severidade da PR em mudas de *Pinus taeda*; d) avaliar a patogenicidade, agressividade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de isolados de *Fusarium* spp. Para detecção foram aplicados três tratamentos em seis lotes de sementes de *Pinus taeda*, sendo quatro repetições de 25 sementes: *blotter test*, papel-cartão e meio seletivo. A transmissão foi avaliada em sementes de seis lotes de *Pinus taeda* durante 60 dias contabilizando-se a percentagem de plântulas emergidas (PE), sementes não germinadas (SNG) e de SNG com *Fusarium* spp. Uma escala descritiva de notas foi desenvolvida para avaliar a severidade de PR em mudas de *Pinus taeda*. A severidade e a incidência da doença foram avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação das mudas de *Pinus taeda* de seis meses de idade. Foi avaliada a patogenicidade, a severidade e a incidência de doze isolados de *Fusarium* spp. obtidos no teste de detecção. Para o teste de patogenicidade e agressividade foram 13 tratamentos com 15 repetições. O método de detecção mais sensível ao detectar *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda* foi o meio seletivo. Não foi observada transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas, no entanto, *Fusarium* spp. causou apodrecimento de sementes na fase de germinação; a escala descritiva permitiu a avaliação da progressão dos sintomas da doença PR; nove isolados de *Fusarium* spp. mostraram-se patogênicos a mudas de *Pinus taeda*, reproduzindo sintomas típicos da PR, sendo o isolado L3R2 o mais agressivo e o que exibiu maior AACPD.

Palavras-chave: patologia florestal; espécie florestal; patologia de semente; sementes florestais.

ABSTRACT

The root rots (RR), caused by the *Fusarium* spp., causes loss of seedling in the nursery that show, initially, discoloration of the needles to a yellowish-green tone followed by apical curvature, wilt and the consequent death of the seedling. The objectives of this work were to: a) define the most appropriate and efficient method to detect *Fusarium* spp. in *Pinus taeda* seeds; b) verify if there is transmission of *Fusarium* spp. from seeds to *Pinus taeda* seedlings; c) develop a descriptive scale to evaluate the severity of the RR in

- 1 Engenheira Agrônoma, Mestre em Produção Vegetal pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná. Centro de Ciências Agrárias, Rua dos Funcionários, 1540, CEP 80035-050, Curitiba (PR), Brasil. thaisawrs@live.com
- 2 Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador da Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, 111, s/n, Caixa Postal 319, CEP 83411-000, Colombo (PR), Brasil. alvaro.santos@embrapa.br
- 3 Engenheiro Florestal, Dr., Pesquisador da Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, 111, s/n, Caixa Postal 319, CEP 83411-000, Colombo (PR), Brasil. celso.auer@embrapa.br
- 4 Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do Departamento de Agronomia na Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá (PR), Brasil. djtessmann@uem.br

Recebido para publicação em 21/02/2013 e aceito em 11/05/2015

Pinus taeda seedlings; d) evaluate the pathogenicity, aggressiveness and area under the disease progress curve (AUDPC) of isolated *Fusarium subglutinans*. For detection three treatments were applied to six lots of *Pinus taeda* seeds, being four repetitions of 25 seeds: blotter test, paper card and selective medium. The transmission was evaluated in seeds from six lots of *Pinus taeda* during 60 days counting the percentage of emerged plantlet (EP), non-germinated seeds (NGS) and from NGS seeds with *Fusarium* spp. A descriptive scale of grades was developed to evaluate the severity of RR in *Pinus taeda* seedlings. The severity and the incidence of the illness were evaluated at 7, 14, 21 and 28 days after the inoculation from *Pinus taeda* seedlings of six months of age. The pathogenicity, severity and incidence of twelve isolated *Fusarium subglutinans* obtained in the detection test. To test for pathogenicity and aggressiveness 13 treatments with 15 replications were applied. The most sensitive detection method to detect *Fusarium* spp. on *Pinus taeda* seeds was the selective medium; transmission was not observed of *Fusarium* spp. from seeds to the seedlings; the descriptive scale allowed evaluating the progression of RR symptoms; nine isolated of *Fusarium* spp. were found to be pathogenic to *Pinus taeda* seedlings, reproducing typical symptoms of RR, being isolated L3R2, the most aggressive and that exhibited higher AUDPC.

Keywords: forest pathology; forest species; seed pathology; forest seeds.

INTRODUÇÃO

Pinus taeda L. é nativo dos Estados Unidos da América. Trata-se de uma espécie exótica no Brasil, entretanto, é cultivada em extensas áreas, principalmente na Região Sul e Sudeste, incluindo as partes serranas do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, bem como as partes mais chuvosas do sul dos estados de São Paulo e Minas Gerais (CONSTANTINO, 2009). No território brasileiro, o consumo de madeira em tora de pinus, para uso industrial, considerando todos os segmentos, foi de 49,8 milhões de m³ (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS, 2012). A indústria madeireira foi o segmento de maior consumo de madeira em tora de pinus, com 54,78% seguidas dos segmentos de celulose e papel com 16,27%, painéis de madeira industrializada com 15,56% e lenha industrial com 12,81% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS, 2012).

A principal doença que ocorre em viveiros de pinus é o tombamento de muda. Entretanto, as podridões-de-raízes podem ocorrer (AUER et al., 2001). Em trabalho realizado por Grigoletti Junior e Auer (2006), mudas de *Pinus taeda* inoculadas com *Fusarium* spp. apresentaram sintomas na parte aérea como a redução do crescimento, descoloração das acículas para um tom verde-amarelado, seguido de murcha e morte a partir dos 10 dias após a inoculação. No sistema radicular, ocorreu redução no desenvolvimento e necrose das raízes atacadas, quando comparadas com raízes de plantas sadias.

A infecção de sementes de espécies florestais por patógenos pode ocorrer tanto naturalmente, no seu local de produção, principalmente nos estágios de floração e formação das sementes, como também nos processos de colheita e beneficiamento das mesmas (JACCOUD FILHO; DABUL, 2011). Como consequência, sementes infectadas por fitopatógenos podem ter redução da germinação, possibilitando a disseminação de doenças transmitidas por sementes para áreas de viveiros de mudas (CARNEIRO, 1987; SANTOS et al., 2011).

A maioria dos patógenos transmitidos por sementes não pode ser detectada por inspeção visual destas, podendo estar contaminadas por esporos (JACCOUD FILHO; DABUL, 2011). A detecção de fungos associados às sementes pode ser feita por diferentes métodos, sendo o mais comum o método papel-filtro, mais conhecido como *blotter test*, meios de culturas como ágar-ágar e batata-dextrose-ágar (BDA) e meios seletivos ou semisseletivos (NEERGAARD, 1979; MAUDE, 1996; 1997; ALVAREZ; KANESHIRO, 1999).

Poucas pesquisas já relataram a associação de *Fusarium* spp. a sementes de *Pinus taeda* (LASCA; SAMPAIO; CINTRA, 1971; CARNEIRO, 1986; HOMECHIN; PIZZINATTO; MENTEN, 1986). Dada a importância para o setor florestal da produção de madeira de *Pinus taeda*, a demanda por mudas vem progredindo e, com isso, os problemas fitossanitários, nos viveiros onde são produzidas as mudas, têm sido ampliados. Portanto, o conhecimento da qualidade de sementes torna-se importante para a formação de mudas de qualidade em viveiro, caso contrário estas poderão originar plântulas doentes ou disseminar microrganismos para áreas ainda isentas (CARNEIRO, 1986; SANTOS et al., 2011).

Devido à falta de informações sobre o patossistema *Pinus taeda* x *Fusarium* spp., em relação à associação do fitopatógeno às sementes, o presente trabalho teve como objetivos: a) determinar o método adequado e eficiente para detecção de *Fusarium* spp. nas sementes de *Pinus taeda*; b) verificar se há transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas de *Pinus taeda*; c) desenvolver uma escala descritiva para avaliar a severidade da PR em mudas de *Pinus taeda*; d) avaliar a patogenicidade e agressividade e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de isolados de *Fusarium* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem do material vegetal, dos isolados de *Fusarium* spp. e local dos experimentos

As sementes de seis lotes (lote 1, lote 2, lote 3, lote 4, lote 5 e lote 11) de *Pinus taeda*, procedentes do município de Arapoti - PR no ano de 2011, foram fornecidas pelo Laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas, Colombo – Paraná. As mudas de seis meses de idade de *Pinus taeda* foram provenientes do viveiro comercial localizado no município de Guarapuava, estado do Paraná. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente. Os experimentos deste estudo foram realizados nos Laboratórios de Patologia Florestal e de Sementes Florestais da Embrapa Florestas.

Três isolados de *Fusarium* spp. utilizados no teste para elaboração da escala descritiva foram isolados a partir de raízes de mudas de *Pinus taeda* que apresentavam sintomas de podridão-de-raízes e outros dois foram obtidos junto à coleção de fungos da Embrapa Florestas. Os doze isolados utilizados no teste de patogenicidade, foram obtidos a partir de sementes, incubadas no teste de detecção, infestadas por *Fusarium*. Estes isolados foram identificados no Laboratório de Fitopatologia na Universidade Estadual de Maringá. Os doze isolados foram identificados como *Fusarium subglutinans* cujos teleomorfos se agrupam no complexo *Gibberella fujikuroi*. Todos os isolados de *Fusarium* spp. utilizados neste experimento e sua respectiva origem estão descritos na Tabela 1.

Qualidade Física e Fisiológica de sementes de *Pinus taeda*

Determinação do grau de umidade (%)

Para a determinação da umidade das sementes de *Pinus taeda*, foram utilizadas duas repetições de 5 g de sementes, as quais foram colocadas em estufa regulada com temperatura a 105°C por 24 horas. A superação de dormência das sementes foi realizada por pré-tratamento, em câmara fria a 5°C por 21 dias. Os resultados foram expressos em percentagem com base no peso úmido das sementes, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Primeiro teste de germinação

Para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes dos seis lotes. As caixas plásticas tipo “gerbox” com as sementes distribuídas foram colocadas em câmara de germinação tipo B.O.D a 20°C por oito horas sem luz e 30°C por 16 horas com luz. A contagem inicial do número de sementes germinadas foi realizada após sete dias da semeadura, e a contagem final, realizada após 28 dias da semeadura. Foram realizados dois testes de germinação: antes e após o pré-esfriamento. As variáveis analisadas foram: percentagem de plântulas normais, plântulas anormais, sementes duras e sementes mortas.

Métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*

Para a detecção de *Fusarium* spp. em sementes de seis lotes de *Pinus taeda*, foram utilizados três diferentes métodos: *blotter test* (BT), papel-cartão (PC) e meio seletivo (MS). O protocolo de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pinus utilizado neste experimento foi baseado em trabalhos de Anderson et al. (1984), Anderson (1986), Neergaard (1979) e Santos et al. (2011), com algumas modificações.

TABELA 1: Lista dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos a partir de sementes e raiz de *Pinus taeda*. Colombo - PR, 2012.TABLE 1: List of isolates of *Fusarium* spp. obtained from seeds and roots of *Pinus taeda*. Colombo, PR state, 2012.

Isolado (código)	Origem	Espécie
L1R1	Semente lote 1	<i>Fusarium subglutinans</i>
L1R3	Semente lote 1	<i>Fusarium subglutinans</i>
L2R2	Semente lote 2	<i>Fusarium subglutinans</i>
L2R3	Semente lote 2	<i>Fusarium subglutinans</i>
L3R2	Semente lote 3	<i>Fusarium subglutinans</i>
L3R3	Semente lote 3	<i>Fusarium subglutinans</i>
L4R1	Semente lote 4	<i>Fusarium subglutinans</i>
L4R4	Semente lote 4	<i>Fusarium subglutinans</i>
L5R1	Semente lote 5	<i>Fusarium subglutinans</i>
L5R3	Semente lote 5	<i>Fusarium subglutinans</i>
L11R1	Semente lote 11	<i>Fusarium subglutinans</i>
L11R2	Semente lote 11	<i>Fusarium subglutinans</i>
04 06	Coleção Embrapa-Florestas	<i>Fusarium</i> sp.
05 06	Coleção Embrapa-Florestas	<i>Fusarium</i> sp.
T3C	Raiz <i>Pinus taeda</i>	<i>Fusarium</i> sp.
TD1	Raiz <i>Pinus taeda</i>	<i>Fusarium</i> sp.
TD2	Raiz <i>Pinus taeda</i>	<i>Fusarium</i> sp.

Blotter test (BT)

As sementes de *Pinus taeda* não desinfestadas, foram esmagadas com auxílio de um bastão de vidro esterilizado e acomodadas em caixas “gerbox” forradas com papel-filtro esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. As sementes foram incubadas a 20°C, sob luz fluorescente, em fotofase de 12 h, por sete dias.

Papel-cartão (PC)

Foi preparado um caldo nutritivo (15 g de peptona, 5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 g de KH_2PO_4 , 1 g de PCNB (pentacloronitrobenzeno) em 1000 mL de água destilada) e vertido sobre uma folha de papel-cartão de cor azul, esterilizado, em quantidade suficiente para saturar a folha de papel (ANDERSON, 1986). O meio foi suplementado com cloranfenicol (40 ppm) e ampicilina (80 ppm). O papel-cartão de cor azul umedecido com o caldo nutritivo foi colocado em caixas “gerbox”, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%. As sementes de pinus não desinfestadas e esmagadas foram colocadas sobre o papel-cartão umedecido com o caldo nutritivo. As caixas “gerbox” foram incubadas a 20°C, sob luz fluorescente, em fotofase de 12 h, por 14 dias.

Meio seletivo (MS)

Este método implica no uso de um meio seletivo para *Fusarium*, preparado com os mesmos produtos

químicos utilizados para o preparo do caldo nutritivo (método PC), adicionado de 20 g de ágar em 1000 mL de água destilada. O meio foi suplementado com cloranfenicol; (40 ppm) e ampicilina (80 ppm).

As sementes de pinus não desinfestadas foram esmagadas com um bastão de vidro e colocadas sobre a superfície do meio seletivo, previamente vertido para placas de Petri. As placas de Petri foram incubadas a 20°C, sob luz fluorescente, em fotofase de 12 h por 14 dias.

As avaliações dos três métodos foram realizadas observando-se as colônias fúngicas crescidas sobre as sementes com auxílio de microscópio estereoscópio e, quando necessário, foi realizado preparo de lâminas, para observação em microscópio óptico (BARNETT; HUNTER, 1998).

Para todos os métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo três tratamentos com quatro repetições cada, totalizando 100 sementes/tratamento.

Transmissão de *Fusarium* spp. de sementes para plântulas de *Pinus taeda*

As sementes de *Pinus taeda* receberam pré-tratamento durante 28 dias a 5°C em câmara fria para quebra de dormência. Para cada um dos seis lotes de sementes, foram semeadas 100 sementes não desinfestadas divididas em quatro repetições de 25, em bandejas de isopor, com uma semente por célula, utilizando como substrato vermiculita. Essas foram mantidas em casa de vegetação durante 60 dias e avaliou-se a percentagem de plântulas emergidas sintomáticas ou não. As sementes não germinadas foram retiradas, lavadas em água esterilizada e colocadas em câmara úmida, na qual permaneceram por sete dias, para identificação de *Fusarium* spp. associados a estas.

Escala descritiva para avaliar a severidade da podridão-de-raízes (PR) em mudas de *Pinus taeda*

Os critérios para a elaboração das notas da escala descritiva foram estabelecidos com base em observações da evolução da doença e as consequentes alterações sofridas pela planta no decorrer do desenvolvimento da PR.

Para elaboração da escala descritiva, 60 mudas de *Pinus taeda* foram inoculadas nas raízes pelo método da imersão. Foi preparada uma suspensão de 10^6 conídios. mL⁻¹ de cinco isolados de *Fusarium* spp, (0406, 0506, T3C, TD1 e TD2) (Tabela 1). As raízes das mudas foram previamente cortadas em 2 cm, a partir do ápice, antes de sua imersão em suspensão de conídios por 30 minutos. A severidade da doença foi avaliada aos 7, 12, 21 e 28 dias após a inoculação.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com seis tratamentos, sendo cinco isolados de *Fusarium* spp. e mais a testemunha (imersão das raízes cortadas em água destilada esterilizada), com dez repetições de uma muda cada.

Avaliação da patogenicidade de isolados de *Fusarium subglutinans* oriundos de sementes de *Pinus taeda*.

Os isolados do gênero *Fusarium* foram obtidos nos testes de detecção, através do isolamento em meio BDA suplementado com cloranfenicol (40 ppm) e ampicilina (80 ppm). A identificação da espécie foi realizada com o uso da reação da polimerase em cadeia (PCR). Para isso, isolados monospóricos foram cultivados em meio batata-dextrose (BD), a 24 °C ($\pm$ 2°C) com fotoperíodo de 12 h por 4 dias e da massa micelial dos isolados foi extraído DNA genômico pelo método CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1991). O DNA dos isolados foi utilizado na PCR para a amplificação de uma porção com aproximadamente 580 pb do gene fator de elongação-1alfa, com os *primers* Ef1 e Ef2 e o protocolo descrito por Geiser et al. (2004). Os fragmentos de DNA foram purificados com o kit ExoSap-IT (GE Health Care), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante, e encaminhados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. As sequências de DNA obtidas foram então comparadas com sequências de *Fusarium* disponíveis no banco de dados *Fusarium-IDv.1.0* (<http://fusarium.cbio.psu.edu>) (GEISER et al., 2004), mostrando identidade de 100% com *F. subglutinans* (Tabela 1).

Para a produção de inóculo, os doze isolados de *Fusarium subglutinans* foram crescidos em BDA,

a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por doze dias. Raízes de mudas de *Pinus taeda*, previamente cortadas em 2 cm, com seis meses de idade, foram imersas em suspensão de 10^6 conídios. mL^{-1} por 30 minutos de cada um dos 12 isolados de *Fusarium* spp. Após este período, as mudas foram plantadas em vasos plásticos contendo vermiculita.

Foram realizadas quatro avaliações, aos 14, 28, 42 e 56 dias após a inoculação, quantificando-se a severidade, utilizando-se a escala descritiva de notas, e a incidência da doença. A partir dos dados de severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN, 1990), baseado na fórmula: $\text{AACPD} = \Sigma(y_i + y_{i+1}) * (t_{i+1} - t_i)$, em que: i = número de avaliações; y = severidade de *Fusarium subglutinans*; t = tempo (dias). Os valores da severidade média aos 56 dias e da AACPD foram submetidos à análise de variância.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 13 tratamentos (12 isolados de *Fusarium subglutinans* mais a testemunha) e 15 repetições de uma muda cada.

Procedimento estatístico

Os dados de todos os testes foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa ASSISTAT, versão 7.6 beta (2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Qualidade Física e Fisiológica das sementes de *Pinus taeda*

A percentagem de plântulas normais, plântulas anormais, sementes duras, dormentes e mortas, relativa aos seis lotes de sementes e o respectivo grau de umidade das sementes da primeira contagem de germinação e germinação estão listadas na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente. O percentual de plântulas normais foi superior quando houve tratamento de pré-esfriamento das sementes para superação de dormência. Isto comprova que o tratamento para superação da dormência de *Pinus taeda* aumenta a percentagem de plântulas normais. O mesmo tratamento reduziu o percentual de plântulas anormais, sementes duras e sementes mortas.

Métodos de detecção de *Fusarium* sp. em sementes de *Pinus taeda*

Foi detectado *Fusarium subglutinans* em sementes de *Pinus taeda* a partir dos métodos BT, PC e MS. Os resultados da avaliação dos métodos de detecção encontram-se na Tabela 4.

Na maioria dos seis lotes de sementes, o método MS foi superior aos demais, exceto no lote 2, cujos

TABELA 2: Primeira contagem de germinação (%) e grau de umidade de seis lotes de sementes de *Pinus taeda*, antes do pré-esfriamento.

TABLE 2: First germination (%) and moisture content of six seed lots of *Pinus taeda*, before pre-cooling.

Primeira contagem de germinação (%) (antes do pré-esfriamento)					
Lote	Plântulas Normais	Plântulas Anormais	Sementes Duras	Sementes Mortas	Grau de Umidade (%)
1	35	9,0	38	18,0	12,9
2	35	9,0	38	18,0	14,1
3	76	5,0	13	6,0	12,9
4	65	4,0	19,0	12,0	13,4
5	66	12,0	15	7,0	13,7
11	59	5,0	30	6,0	13,7

Em que: Pré-esfriamento: tratamento para superação de dormência de sementes de *P. taeda* realizada em câmara fria a 5°C por 21 dias

TABELA 3: Germinação (%) e grau de umidade de seis lotes de sementes de *Pinus taeda* após o pré-esfriamento.TABLE 3: Germination (%) and moisture content of six seed lots of *Pinus taeda*, after pre-cooling.

Lote	Teste de germinação (%) (após o pré-esfriamento)				Grau de Umidade (%)
	Plântulas Normais	Plântulas Anormais	Sementes Duras	Sementes Mortas	
1	71	4,0	20	5,0	12,9
2	51	3,0	38	8,0	14,1
3	81	3,0	10	6,0	12,9
4	88	4,0	5,0	3,0	13,4
5	75	4,0	17	4,0	13,7
11	61	4,0	28	7,0	13,7

Em que: Pré-esfriamento: tratamento para superação de dormência de sementes de *P. taeda* realizada em câmara fria a 5°C por 21 dias

métodos não diferiram entre si na detecção de *Fusarium subglutinans*. No lote 5, os métodos de PC e MS não diferiram entre si, todavia, estes dois métodos foram superiores ao BT (Tabela 4).

Nos lotes 1 e 3, os métodos BT e PC não diferiram entre si na detecção de *Fusarium subglutinans*, sendo menos sensíveis do que o método MS. Entretanto, o mesmo não foi observado nos lotes 4 e 11, cujos três tratamentos diferiram entre si (Tabela 4).

O método MS apresentou maior sensibilidade para a detecção de *Fusarium subglutinans* em sementes de *Pinus taeda*, quando comparado aos outros métodos testados (BT e PC). Em pesquisa realizada por Anderson (1986), foram testados dois métodos de detecção (similares aos métodos PC e MS estudados neste trabalho) de *Fusarium subglutinans* em três lotes de sementes com diferentes incidências de *Fusarium subglutinans*. Foram constatadas frequências de *Fusarium subglutinans* similares entre os três lotes de sementes avaliados e entre os dois métodos. Estes dados que corroboram com os resultados observados no lote 5 deste trabalho.

Em outros estudos com sementes florestais, os métodos de detecção *blotter test* e batata-dextrose-água (BDA) foram igualmente eficientes em detectar *Fusarium* em sementes de cedro (RUIZ FILHO et al., 2004; BENETTI et al., 2009) e em sementes de paineira (LAZAROTTO et al., 2010).

As diferenças observadas neste trabalho entre a eficiência dos métodos de detecção de *Fusarium* sp. podem ser explicadas pela seletividade apresentada pelos métodos MS e PC, restringindo o crescimento micelial de outros gêneros fúngicos e permitindo o crescimento micelial de *Fusarium*.

Transmissão de *Fusarium* sp. de sementes para plântulas de *Pinus taeda*

Não houve transmissão de *Fusarium* sp. de sementes para as plântulas no teste realizado. Porém, a presença de *Fusarium* sp. nas sementes afetou seu desenvolvimento no período de germinação. Os resultados da avaliação da transmissão de *Fusarium* de sementes para as plântulas de *Pinus taeda* encontram-se na Tabela 5.

As sementes dos seis lotes utilizadas neste experimento apresentaram diferenças significativas na percentagem de plântulas emergidas (PE) e de sementes não germinadas (SNG) (Tabela 5). É possível afirmar, que esta diferença significativa na percentagem de PE e de SNG possa ser atribuída à variação da qualidade fisiológica entre os lotes de sementes (Tabelas 2 e 3).

Não se verificaram plântulas sintomáticas em PE, enquanto que as SNG apresentaram incidências de *Fusarium* spp. que variaram de 21% (lote 2) a 37% (lote 1), evidenciando a presença de *Fusarium* sp. nas sementes, impedindo a germinação destas. Entretanto, a incidência de *Fusarium* sp. nas SNG não variou significativamente entre os lotes, evidenciando a importância da qualidade fisiológica, além da qualidade sanitária, na germinação das sementes (Tabela 5).

TABELA 4: Incidência média (%) de *Fusarium subglutinans*. em sementes de seis lotes de *Pinus taeda* pelos três métodos de detecção: *blotter test*, papel-cartão e meio seletivo (Colombo – PR / 2012).

TABLE 4: Average incidence (%) of *Fusarium subglutinans* in six seed lots of *Pinus taeda* by the three detection methods: blotter test, paper card and selective medium (Colombo, PR state / 2012).

Incidência média de <i>Fusarium</i> (%)						
Tratamento	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 11
<i>Blotter Test</i> (BT)	13 a	7a	4a	33b	10a	5a
Papel-Cartão (PC)	16 a	12a	11a	7a	30b	26b
Meio Seletivo (MS)	67 b	16 a	34 b	94c	39b	48c

Em que: Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 5: Percentagem de plântulas emergidas (PE), sementes não germinadas (SNG) e SNG com *Fusarium* sp. de seis lotes de sementes de *Pinus taeda* (Colombo - PR / 2012).

TABLE 5: Percentage of seedlings (PE), non-germinated seeds (SNG) and SNG with *Fusarium* spp. six seed lots of *Pinus taeda* (Colombo, PR state/2012).

Lotes	PE (%)	SNG (%)	SNG com <i>Fusarium</i> (%)
Lote 1	43,00 c	57,00 b	36,84 a
Lote 2	39,00 c	61,00 b	21,31 a
Lote 3	77,00 a	23,00 d	26,09 a
Lote 4	17,00 d	83,00 a	30,12 a
Lote 5	33,00 c	67,00 b	34,33 a
Lote 11	57,00 b	43,00 c	32,56 a
CV (%)	11,74	9,35	41,35

Em que: Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

De acordo com os dados obtidos, não é possível afirmar que houve transmissão de *Fusarium* sp. das sementes para as plântulas. No entanto, é possível afirmar que houve efeito deletério na fase de germinação, uma vez que em todos os lotes pode-se atribuir a não germinação das sementes em mais de 21% em consequência da presença de *Fusarium* sp. Esta constatação concorda com Carneiro (1987), que afirma que *Fusarium* pode ser transmitido via sementes infectadas durante a germinação causando danos em pré-emergência destruindo as sementes.

Neste trabalho não foram observadas lesões em plântulas no período de pós-emergência, todavia, vários estudos relatam a transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas. Lazarotto et al. (2010) demonstraram a transmissão de *Fusarium* spp. das sementes de paineira para as plântulas. Lazarotto et al. (2012) relataram que houve transmissão de *Fusarium* spp. em sementes de *Cedrela fissilis* causando danos nas raízes e, provocando posterior tombamento das plântulas. Em sementes de *Pinus elliottii* foi confirmada a patogenicidade de *Fusarium sambucinum* isolado das sementes para as plântulas, e foram constatados sintomas de apodrecimento da parte aérea (MACIEL, 2013).

Escala descritiva para avaliar a severidade da podridão-de-raízes (PR) em mudas de *Pinus taeda*

Na Tabela 6 são apresentados os resultados dos sintomas e das respectivas notas referentes à escala descritiva da doença aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação das mudas.

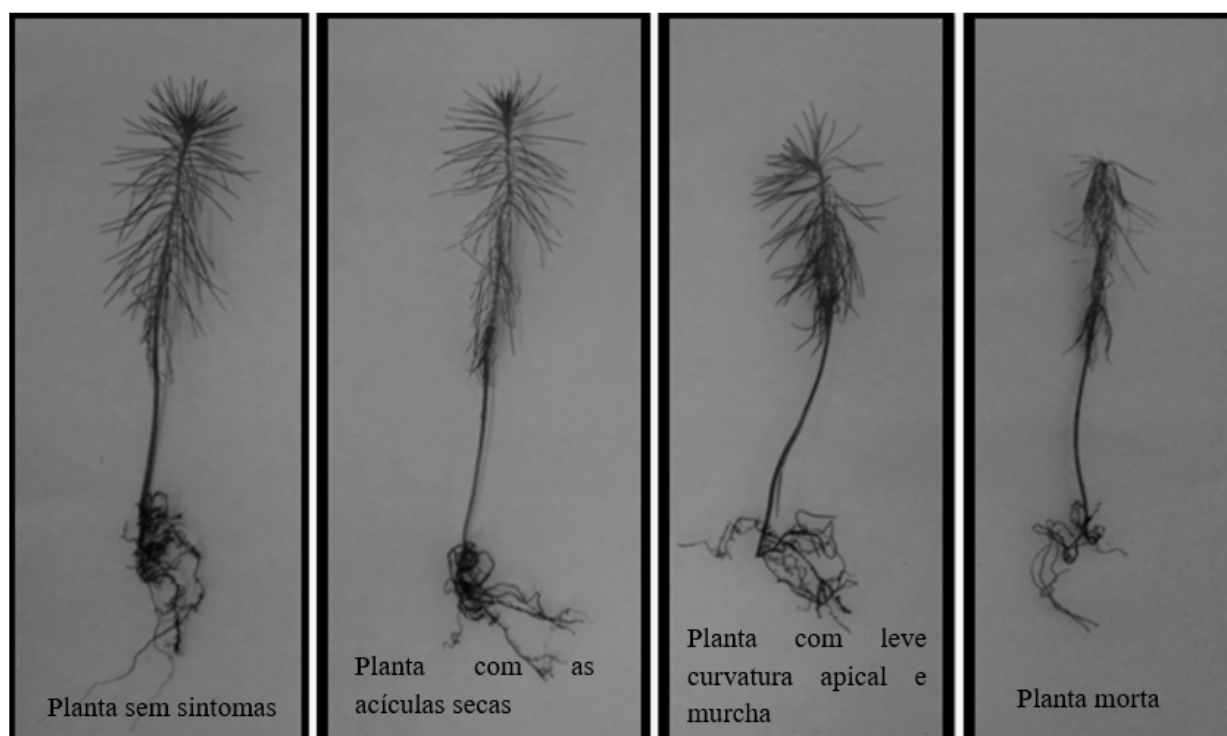


FIGURA 1: Escala descritiva para avaliação da podridão-de-raízes em mudas de *Pinus taeda* inoculadas com suspensão de conídios de *Fusarium* spp.

FIGURE 1: Descriptive scale for assessment of root rot in seedlings of *Pinus taeda* inoculated with spore suspension of *Fusarium* spp..

A escala descritiva desenvolvida para avaliação da severidade da PR em mudas de *Pinus taeda* encontra-se na Figura 1. As plantas de *Pinus taeda* inoculadas com *Fusarium* sp. apresentaram descoloração das acículas, murcha com leve curvatura apical, seguido de murcha total, ocasionando a morte da planta. Além dos sintomas de parte aérea, foi observada estagnação no crescimento radicular. Os mesmos sintomas foram relatados por Grigoletti Junior e Auer (2006). Com base nesses sintomas observados no viveiro, foi possível desenvolver uma escala descritiva com quatro notas: 0 - planta sem sintomas; 1 - planta com as acículas descoloridas; 2 - planta com leve curvatura apical e murcha; 3 - planta morta.

Todos os isolados de *Fusarium* spp. inoculados causaram sintomas nas mudas de *Pinus taeda*, exceto o isolado T3C que não foi patogênico. Ao final das avaliações, as mudas inoculadas com o isolado 0506 apresentaram 90% de incidência de *Fusarium* e, a partir dos 14 dias após a inoculação, os sintomas da doença evoluíram, provocando a morte das mudas. Os valores de severidade e incidência da doença são apresentados na Tabela 6. Em trabalho realizado com diferentes isolados de *Fusarium* spp., foi relatado que o isolado endofítico Cac19.4, além de não causar nenhum sintoma em plantas de soja e tomate, ainda promoveu o crescimento vegetal, aumentando o peso da raiz e caule de plântulas de soja e tomate (MARTINS, 2005). Isto evidencia que nem todos os isolados de *Fusarium* spp. são patogênicos às plantas.

Teste de patogenicidade e agressividade dos isolados de *Fusarium* spp. encontrados no teste de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*

Os valores da severidade e incidência média e a AACPD dos isolados de *Fusarium subglutinans* nas mudas de *Pinus taeda* inoculadas com o fitopatógeno estão descritos na Tabela 7.

No teste de patogenicidade e agressividade, em que foram avaliados sintomas da podridão-de-raiz, apenas três dos doze isolados de *Fusarium* spp. não se mostraram patogênicos as mudas de *Pinus taeda*, são eles: L4R1, L5R1 e L11R1 (Tabela 7). Os demais isolados provocaram sintomas típicos da doença;

TABELA 6: Severidade e incidência da podridão-de-raiz em mudas de *Pinus taeda*, inoculadas com suspensão de conídios de seis isolados de *Fusarium* spp. (Colombo – PR / 2012).TABLE 6: Severity and incidence of root rot in seedlings of *Pinus taeda*, inoculated with spore suspension of six isolates of *Fusarium* spp. (Colombo, PR state/2012).

DAI	Tratamentos	Severidade (Nota)	Incidência (%)
7	04 06	2	40
	05 06	2	30
	T3C	0	0
	TD1	2	10
	TD2	2	20
	Testemunha	0	0
14	04 06	3	40
	05 06	3	40
	T3C	0	0
	TD1	3	20
	TD2	3	30
	Testemunha	0	0
21	04 06	3	50
	05 06	3	40
	T3C	0	0
	TD1	3	50
	TD2	3	30
	Testemunha	0	0
28	04 06	3	70
	05 06	3	90
	T3C	0	
	TD1	3	60
	TD2	3	30
	Testemunha	0	0

Em que: DAI dias após a inoculação; Escala descritiva: 0 - planta sem sintomas; 1 - planta com as acículas descoloridas; 2 - planta com leve curvatura apical e murcha; e 3 - planta morta.

entretanto, os isolados apresentaram diferentes níveis de agressividade.

O isolado que exibiu a maior severidade média ao final dos 56 dias após a inoculação, foi o isolado L3R2. A nota da severidade média deste isolado foi de 1,67, baseado na escala descritiva dos sintomas da podridão-de-raiz, diferindo estatisticamente dos demais isolados, exceto dos isolados L2R2 e L2R3 de *Fusarium subglutinans*, os quais proporcionaram 1,0 e 0,93 de severidade, respectivamente. O isolado L3R2 também exibiu maior AACPD diferindo estatisticamente dos demais isolados de *Fusarium subglutinans*.

Em trabalho realizado por Grigoletti et al. (2006), cerca de 60% das mudas que tiveram suas raízes imersas em suspensão de 10^6 conídios $m.L^{-1}$ de *Fusarium* spp. reproduziram sintomas típicos da doença podridão-de-raízes, comprovando a patogenicidade de *Fusarium* em mudas de *Pinus taeda*. No presente trabalho foram constatados sintomas como secamento da parte apical das acículas (descoloração das acículas), leve curvatura apical e murcha, necrose, escurecimento das raízes e estagnação do crescimento das raízes, assemelhando-se aos descritos por Grigoletti et al. (2006).

TABELA 7: Incidência e severidade média de doze isolados de *Fusarium* spp. em mudas de *Pinus taeda* inoculadas com suspensão de 10^6 conídios mL⁻¹.TABLE 7: Incidence and average severity of twelve isolates of *Fusarium* spp. in *Pinus taeda* seedlings inoculated with suspensions of 10^6 conidia mL⁻¹.

Dias de Avaliação após a Inoculação (DAÍ)									
14			28		42		56		AACPD
Isolado	Severidade ¹	Incidência ²	Severidade	Incidência	Severidade	Incidência	Severidade	Incidência	
L1R1	0,13	13,33	0,33	33,33	0,33	33,33	0,33 bc	33,33	4,20 c
L1R3	0,13	13,33	0,33	33,33	0,40	40,00	0,40 bc	40	4,67 c
L2R2	0,40	33,33	0,73	66,67	0,87	66,67	1,00 ab	80	10,73 b
L2R3	0,20	20,00	0,33	33,33	0,60	60,00	0,93 ab	73,33	7,00 bc
L3R2	1,13	60,00	1,53	73,33	1,60	73,33	1,67 a	73,33	21,16 a
L3R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	13,33	0,33 bc	13,33	2,33 c
L4R1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
L4R4	0,13	13,33	0,27	26,67	0,27	26,67	0,27 bc	26,67	3,42 c
L5R1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
L5R3	0,00	0,00	0,20	13,33	0,53	20,00	0,53 bc	20,00	4,67 c
L11R1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
L11R2	0,33	33,33	0,47	46,67	0,60	60,00	0,60 bc	60,00	7,16 bc
Testemunha	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CV(%)							46,54	28,92	

Em que: ¹Valores de severidade da doença de acordo com a escala descritiva baseada em sintomas: Nota 0 - planta sem sintomas; Nota 1 - planta com as acículas descoloridas; Nota 2 - planta com leve curvatura apical e murcha; Nota 3 - planta morta. ²Valores de incidência expressos em percentagem. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

O método meio seletivo foi o que apresentou maior sensibilidade para detecção de *Fusarium subglutinans* em sementes de *Pinus taeda*;

Não houve transmissão de *Fusarium* sp. das sementes para as plântulas; no entanto, *Fusarium subglutinans* causou apodrecimento de sementes na fase de germinação;

A escala descritiva permitiu a avaliação dos sintomas da podridão-de-raiz causada por *Fusarium* spp. em mudas de *Pinus taeda*.

Dentre os 12 isolados de *Fusarium* spp. avaliados, o isolado L3R2 de *Fusarium subglutinans* apresentou maior agressividade às mudas de *P. taeda*;

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário Estatístico da ABRAF 2012**: ano base 2011. Brasília: ABRAF, 2012.
- ALVAREZ, A. M.; KANESHIRO, W. S. Detetion and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed. In: INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION: PLANT DISEASE COMMITTEE, 3., 1999, Iowa. **Procedings...** Zurich: ISTA, 1999. p. 93-97.
- AUER, C. G. et al. **Doenças em Pinus**: identificação e controle. Colombo: Embrapa Florestas, 2001.
- ANDERSON, R. L. A new method for assessing contamination of slash and loblolly pine seeds by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 5, p. 452-453, 1986.
- AUER, C. G. et al. Occurrence of seed fungi inside slash pine seeds produced in seed orchards in the United States. **Seed Science and Technology**, Zurich, n. 12, p. 795-799, 1984.

- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th. ed. Saint Paul: APS Press, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regra para análise de sementes**. Brasília: MAPA, 2009.
- BENETTI, S. C. et al. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 81-85, jan./jun. 2009.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. (Ed.). **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley, 1990. 532 p.
- CARNEIRO, J. S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 557-566, 1986.
- CARNEIRO, J. S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 386-393.
- CONSTANTINO, V. **Efeitos de métodos de produção de mudas e equipes de plantadores na arquitetura do sistema radicular e no crescimento de *Pinus taeda* Linnaeus**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- GEISER, D et al. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 473-479, 2004.
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. **Fusariose em mudas de *Pinus taeda***. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. (Comunicado Técnico, 166).
- HOMECHIN, M; PIZZINATTO, M. A; MENTEN, J. O. M. Sanidade de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* em plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 12, p. 102-112, 1986.
- JACCOUD FILHO, D. S.; DABUL, A. N. G. Novos métodos de detecção de fungos em sementes florestais. In: SANTOS, A. F. et al. **Patologia de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. p. 69-86.
- LASCA, C. C.; SAMPAIO, A. S.; CINTRA, A. F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. **O Biológico**, São Paulo, v. 37, n. 11, p. 287-292, 1971.
- LAZAROTTO, M. et al. 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.
- LAZAROTTO, M. et al. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, jul./set. 2012.
- MACIEL, C. G. et al. First Report of *Fusarium sambucinum* associated on *Pinus elliottii* seeds in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, n. 7, 2013.
- MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.
- MAUDE, R. B. **Seedborne diseases and their control: principles**. Wallingford: CAB International, 1996. 280 p.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: McMillan Press, 1979. v. 1, 839 p.
- RUIZ FILHO, R. R. et al. Fungos associados às sementes de cedro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 494-496, 2004.
- SANTOS, A. F. et al. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 236 p.