



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

JOÃO ELVES DA SILVA SANTANA

**FUNGOS EM SEMENTES DE TRÊS ESPÉCIES FLORESTAIS EXÓTICAS
COLETADAS NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, RJ**

Prof. Dr. PAULO SERGIO TORRES BRIOSO
Orientador

SEROPÉDICA, RJ
DEZEMBRO – 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

JOÃO ELVES DA SILVA SANTANA

**FUNGOS EM SEMENTES DE TRÊS ESPÉCIES FLORESTAIS EXÓTICAS
COLETADAS NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, RJ**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. PAULO SERGIO TORRES BRIOSO
Orientador

SEROPÉDICA, RJ
DEZEMBRO – 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, proteção e sabedoria concedida a mim, meus familiares e amigos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela experiência fantástica que tive durante a graduação.

Ao professor Paulo Sergio Torres Brioso, pela amizade e orientação que propiciaram o enriquecimento da minha formação acadêmica.

Aos membros da banca, Professor Tiago Boer Breier, Géssica Mylena Santana Rêgo, Natali Ribeiro e Jose Leonardo Santos Jimenez pela participação neste trabalho.

À todos os membros do Laboratório Oficial de Diagnostico Fitossanitário da UFRRJ.

Aos meus pais Maria Graciene e Francisco Iuris, meu tio Jerre Carlos e meus irmãos Elis Regina, Isabela Santana, Isadora Santana, Alexandre Lima, Iuris Lima e Ulisses Santana pela infância.

À Ana Caroline, Tânia Regina e Jorge Magno pela segunda família que me ofereceram.

Aos amigos da turma 'Engenharia Florestal 2012-II'.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos meus
familiares e amigos.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o levantamento da microflora fúngica associada as sementes das espécies exóticas *Cassia fistula*, *Pseudosamanea guachapele* e *Tecoma stans*, coletadas no município de Seropédica, RJ. A detecção dos fungos foi realizada através do *Blotter Test* adotando dois tratamentos, um primeiro tratamento (SA) com sementes desinfestadas previamente com NaClO a 0,25% por um minuto e um segundo tratamento (SNA) com sementes sem desinfestação. A incubação das sementes foi realizada em Estufa B.O.D. a 24+1°C por sete dias, a identificação foi realizada através da observação das estruturas fúngicas em microscópio Estereoscópico e Ótico e Teste de PCR com *primers* para a região ITS. Para os fungos potencialmente fitopatogênicos procedeu-se o teste de patogenicidade, com o contato do micélio fúngico com folhas de indivíduos saudáveis. Foram detectados os fungos *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria alternata* e *Fusarium* sp. A desinfestação prévia das sementes reduziu parte dos fungos associados às sementes. O fungo *Alternaria alternata* foi patogênico a espécie botânica *Tecoma stans*.

Palavras-chave: Patologia de sementes florestais, fungos, *Alternaria alternata*, *Tecoma stans*

ABSTRACT

This study aimed to survey the fungi associated with the seeds of exotic species *Cassia fistula*, *Pseudosamanea guachapele* and *Tecoma stans*, collected in the city of Seropédica, RJ. Detection of fungi was carried out using the Blotter Test adopting two treatments, a first treatment (SA) with seeds previously sterilized with NaClO 0.25% for a minute and a second treatment (SNA) with no seed disinfection. Incubation of seeds was carried out in greenhouse B.O.D. $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ for seven days, the identification was carried out by observation of fungal structures under a microscope stereoscopic and optical and PCR test with primers for the ITS region. For potentially pathogenic fungi proceeded to the pathogenicity test, with the contact of the mycelium with leaves of healthy individuals. Was detected fungi *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria alternata* and *Fusarium* sp. The previous seed disinfestations reduced part of the fungi associated with seeds. The fungus *Alternaria alternata* was pathogenic to botanical species *Tecoma stans*.

Keywords: seeds of forest pathology, fungi, *Alternaria Alternata*, *Tecoma stans*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1. Associação entre fungos e sementes de espécies florestais	1
2.2. <i>Cassia fistula</i> L.	3
2.3. <i>Pseudosamanea guachapele</i> (Kunth) Dugand.	4
2.4. <i>Tecoma stans</i> Juss. ex Kunth	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1. Origem das Sementes e local dos Ensaio s	5
3.2. Detecção, identificação e cultivo <i>in vitro</i> dos fungos associados às sementes	5
3.2.1. Teste de incubação em substrato de papel (Teste de <i>Blotter Test</i>)	5
3.2.2. Avaliação da incidência fúngica nas sementes	6
3.2.3. Identificação em Microscópio Estereoscópico e Ótico	6
3.2.4. Isolamento de fungos fitopatogênicos	6
3.2.5. <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	6
3.3. Teste de patogenicidade para fungos potencialmente fitopatogênicos	7
4.1. Fungos associados às sementes das espécies <i>Cassia fistula</i> , <i>Pseudosamanea guachapele</i> e <i>Tecoma stans</i>	7
4.2. <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	10
4.3. Patogenicidade de <i>Alternaria alternata</i> para <i>Tecoma stans</i>	10
5. CONCLUSÕES	11
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies florestais cujas sementes foram analisadas quanto à sanidade no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ..... 5

Tabela 2: Incidência de fungos nas sementes de *Cassia fistula*, *Pseudosamanea guachapele* e *Tecoma stans* após o Teste de Blotter Test. SA - sementes desinfestadas previamente com NaClO a 0,25% por um minuto e SNA - sementes sem desinfestação prévia com NaClO a 0,25% por um minuto. 7

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Isolados fúngicos de sementes de espécies florestais. A – *Rhizopus sp.* detectado em sementes de *Tecoma stans*; B - *Fusarium sp.* detectado em sementes de *Pseudosamanea guachapele*. 10
- Figura 2:** Teste de Patogenicidade de isolado fúngico em tecido foliar de *Tecoma stans*. A e B - Inoculação com meio de cultura BDA sem presença de fungo; C e D - Manchas foliares ocasionadas pela inoculação de *Alternaria alternata* oriunda de sementes..... 11

1. INTRODUÇÃO

O aumento das áreas com plantações florestais, seja de espécies exóticas ou nativas, requer a cada ano maior oferta de sementes (SANTOS et al., 2015). Uma crescente demanda de sementes reflete a necessidade do estabelecimento de padrões de qualidade das mesmas como material propagativo.

Os fatores que determinam a qualidade das sementes podem ser reunidos em quatro classes distintas: fatores genéticos, fatores, físicos e sanitários. Esse último grupo de fatores se caracterizam pelo efeito prejudicial resultado pela ocorrência de microrganismos e insetos associados às sementes, desde o campo de produção até o armazenamento (LUCCA FILHO, 2006).

De modo geral, as sementes podem atuar como fonte de abrigo e transporte de microrganismos de todos os grupos taxonômicos, que podem ser patogênicos ou não, tornando-se assim a detecção desses organismos uma ferramenta importante no manejo fitossanitário de doenças (BARROCAS & MACHADO, 2010). Como destaca Mendes et al. (2011) para obtenção de uma boa muda é importante a realização do controle da qualidade sanitária das sementes, visto que estas são um possível veículo de propagação e disseminação de organismos fitopatogênicos.

Várias espécies de fungos já foram descritas associadas às sementes de espécies florestais. Apesar disso, como destaca Santos et al. (2015), ainda é necessário maior número de pesquisas em patologia de sementes florestais, evitando que a questão sanitária não se torne um problema na produção de mudas e, conseqüentemente, na implantação de plantios comerciais e de restauração florestal.

Além disso, na busca de sementes de boa qualidade há necessidade que seja implantado um programa de certificação de sementes para sanidade, porém a falta de informações oriundas de pesquisa sobre patologia de sementes florestais dificulta essa ação (VECHIATO & PARISI, 2013).

Muitas espécies florestais exóticas são utilizadas no Brasil para atender várias funções, como por exemplo, plantios comerciais e componente da arborização urbana. Tendo em vista o apresentado, o objetivo desse trabalho foi realizar o levantamento da diversidade fúngica associada às sementes das espécies florestais exóticas *Cassia fistula*, *Pseudosamanea guachapele* e *Tecoma stans*, coletadas no município de Seropédica, RJ.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Associação entre fungos e sementes de espécies florestais

As sementes podem ser contaminadas por diversos patógenos, desde o campo às operações posteriores de colheita, secagem e beneficiamento (CARNEIRO, 1987). Quando ainda está dentro do fruto, ligada a planta, a contaminação de patógenos pode resultar da própria matriz quando esta se encontra doente ou da infecção dos frutos que subseqüente atingem as sementes (SANTOS et al., 2015).

Após a dispersão dos frutos, é comum a associação devido à queda das sementes no chão, havendo o contato com a matéria orgânica onde muitos patógenos sobrevivem saprofiticamente. Normalmente na colheita de espécies arbóreas já se tem os frutos abertos onde pode ocorrer contaminações via ventos, chuvas e insetos (SANTOS et al., 2011).

Os patógenos são classificados pela sua localização nas sementes, segundo Lucca Filho (2006), a associação ocorre de duas maneiras, a primeira quando os microrganismos estão infestando as sementes, localizados externamente misturados e/ou aderidos à superfície das mesmas, enquanto que na segunda estão no interior infectando tecidos como cotilédones e embrião.

Os fungos representam o maior grupo de microrganismos encontrados em sementes, seguido pelas bactérias, os vírus e os nematóides, sendo que esses dois últimos grupos ocorrem em menor número. Dentre os fungos fitopatogênicos, a maioria pode ser transmitida para planta via sementes (BRASIL, 2009).

As espécies fúngicas, neste contexto, podem ser agrupadas em fungos de campo ou de armazenamento. Espécies de campo se estabelecem nas sementes antes da colheita, durante o crescimento e maturação. Nesse grupo encontram-se a maior parte das espécies fitopatogênicas. Os fungos de armazenamento, invadem a semente após a maturação, durante a colheita, beneficiamento e secagem, sendo representados principalmente pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (VECHIATO & PARISI, 2013).

A contaminação por fungos, pode resultar em diversos danos nas sementes durante o armazenamento, condução de testes de germinação, em plântulas e mudas produzidas em viveiros florestais. Além disso, a epidemia de muitas doenças pode resultar do inoculo contido na semente, sendo dos veículos mais importantes na transmissão de patógenos.

Ferreira (1989), destaca a contaminação fúngica como um dos problemas sérios nos estudos de germinação, dificultando o diagnóstico correto da qualidade fisiológica do lote em testes realizados em incubadoras ou germinadores, onde as condições são ideais para o desenvolvimento de alguns fungos, resultando em danos como apodrecimento das sementes.

Outros problemas como anormalidade e lesão na plântula, deterioração de semente, redução na germinação, na emergência de plântulas e no vigor podem resultar da presença desses organismos (PIVETA et al., 2014).

Vários estudos têm demonstrado a diversidade fúngica associada a sementes de diferentes espécies florestais exóticas e nativas. Santos et al. (2011) apresenta uma listagem com informações disponíveis na literatura sobre as espécies contaminantes, hospedeiros e métodos de detecção utilizados. *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Trichoderma* estão entre os gêneros comumente encontrados em sementes (SANTOS, 2000).

Lazarotto et al. (2012) analisando sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vellozo) na região sul do Brasil detectaram os fungos *Alternaria* sp., *Ascochyta* sp., *Aspergillus* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Sphaeropsis* sp. e *Trichoderma* sp.. Os autores ainda afirmam que os gêneros *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp. podem ser transmitidos das sementes para as plântulas, sendo este último também patogênico para cedro, causando manchas ou queima nos cotilédones e primeiras folhas verdadeiras, apodrecimento do colo, seguido de tombamento da plântula devido à associação do patógeno com as raízes.

Para a espécie açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart.) foram detectados *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp. e *Cladosporium* sp. nas sementes, além da presença de *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium*

sp., *Cladosporium* sp. e *Alternaria* sp. contaminando os frutos da espécie (MACIEL et al., 2013).

Maciel et al. (2012) estudando aroeira pimenteira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.) observaram que no teste de transmissão de *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. houve um percentual de plântulas sintomáticas de 22%, sendo este último patogênico para a espécie estudada, causando manchas foliares.

Apesar dos diversos estudos realizados, como destaca Santos et al. (2011), a área de patologia de sementes florestais não tem recebido a devida atenção, sendo necessário maior número de pesquisas que realizem o levantamento dos fungos e avaliem seu efeito para as sementes e espécie florestal.

Além das informações sobre sanidade de sementes de espécies nativas, é necessário o conhecimento acerca de espécies exóticas, visto que, muitas destas são utilizadas no Brasil para atender usos diversos.

2.2. *Cassia fistula* L.

C. fistula é uma espécie originária da Índia pertencente à família Fabaceae. Conhecida popularmente pelos nomes de chuva-de-ouro, cassia-imperial, cana-fístula, cássia-fístula, e acácia imperial, é uma árvore de pequeno porte e pode atingir de 10 a 15 metros de altura, apresenta florescimento de coloração amarelo-limão ou amarelo ouro, que ocorre entre os meses de setembro e outubro. Produz vagens lenhosas, cilíndricas, indeiscentes, pretas ou marrom escuras, quebradiças (BOSCARDIN et al., 2012).

A madeira de *C. fistula* possui característica de cerne muito duro, com longa durabilidade, adequada para usos na construção naval, marcenaria de luxo, postes, cabos de ferramentas e de instrumentos agrícolas. A poupa que envolve as sementes da espécie é utilizada como tempero (GUEDES et al., 2013).

Segundo Luximon-ramma et al. (2002) a árvore também possui valor terapêutico com efeitos cicatrizantes, antipiréticos, analgésicos e hipoglicemiantes, pode ser utilizada para tratamento de hipercolesterolemia, bem como laxante moderado para mulheres grávidas e crianças.

Na arborização é utilizada devido às flores amarelas reunidas em cachos (Figura 1) se propaga fundamentalmente por sementes que podem ser atacadas por microrganismos, nematóides e insetos que prejudicam a germinação (FERRAZ & CARVALHO, 2001).

A nível fitossanitário a espécie pode ser hospedeira do fungo *Phyllachora bakeriana* P. (Henn) que manifesta manchas foliares (SOUZA, 2012). As sementes podem ser danificadas pelo ataque do inseto *Pygio pachymeruslineola* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) (FERRAZ & CARVALHO, 2001).

2.3. *Pseudosamanea guachapele* (Kunth) Dugand.

Pseudosamanea guachapele é uma espécie arbórea da família Fabaceae, encontrada naturalmente desde o sudeste do México através da América central, equador na América do Sul e nas Ilhas do Caribe, sendo plantada na Costa Rica, Guatemala e Honduras (CORDERO et al., 2003). Segundo Geilfus (1989) possui porte alto, podendo alcançar cerca de 25 metros de altura.

A espécie é utilizada na América Central como árvore de sombra em pastagens, forragem para gado, para madeira de serraria, construção rural como vigas, tabuas, pisos e dormentes (CORDERO et al., 2003). No Brasil tem sido citada pelo seu potencial como leguminosa fixadora de N₂ atmosférico.

P. guachapele tem mostrado boa adaptação nas condições edafoclimáticas do sudeste brasileiro, com uma elevada capacidade de ciclar nutrientes, via formação de serapilheira e decomposição de seus resíduos no solo (FROUFE, 1999), surgindo como alternativa interessante ao manejo de solos com baixa fertilidade.

Em consórcios com eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) a decomposição de folhas e ramos de *P. guachapele* aumenta a qualidade nutricional da serapilheira promovendo um melhor equilíbrio populacional da microbiota presente no solo (FREIXO et al., 2000).

Segundo Baliero et al. (2004) nos plantios consorciados dessas espécies, quando comparado com o plantio apenas de eucalipto, a quantidade de nitrogênio aportada ao solo, bem como a velocidade que ocorre a mineralização dos resíduos é superior, o que pode refletir maior fertilidade e favorecer o crescimento do eucalipto. Ainda segundo Baliero et al. (2007) aos cinco anos, o consórcio resultou em maior produtividade de madeira e aumento na eficiência de utilização de nutrientes.

A nível de sementes não se tem registros de pragas e doenças, no entanto, a mesma pode ser atacada em viveiro pelas espécies de pulgão *Agrotis* sp. e *Oncideres* sp. (GEILFUS, 1989).

2.4. *Tecoma stans* Juss. ex Kunth

Conhecida popularmente como Ipê-amarelo-de-jardim ou amarelinho, *T. stans* é uma espécie arbustivo-arbórea, exótica no Brasil e pertencente à família botânica Bignoniaceae (LORENZI, 2000). Segundo Cipriani et al. (2014) a espécie é natural do México e do sul dos Estados Unidos, introduzida originalmente no Brasil como planta ornamental, e ocorrendo como planta cultivada ou subespontânea por quase todo o país.

Kranz & Passini (1997) descrevem a espécie como arbusto ou pequena árvore que atinge de 8 a 12 metros de altura, possuindo folhas compostas, imparipenadas, sendo o fruto uma cápsula glabra com sementes aladas. Além de via sementes, se propaga por pedaços de ramos e de raízes e apresenta crescimento vigoroso com intensas brotações.

Não se sabe quando *T. stans* foi introduzida no Brasil. Kranz & Passini (1997) destacam uma grande procura por plantas ornamentais, durante o século XIX, para atender a formação de jardins botânicos e ornamentação de mansões de imperadores, de pessoas pertencentes à corte, grandes proprietários de terra e novos ricos que se formavam com o início da industrialização. A introdução da espécie pode ter ocorrido nesse período.

Como planta ornamental, é encontrada em muitas cidades do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, presente em levantamentos florísticos da arborização urbana de vários municípios (PESTANA, 2011).

Além do uso como componente urbano, como menciona Cipriani et al. (2014), a espécie passou a ocorrer como planta cultivada ou subespontânea em quase todas regiões do país.

Devido a sua ampla produção de sementes, *T. stans* passou a ser citada como espécie invasora de pastagens e de terrenos baldios (LORENZI, 2000).

Na região sul do Brasil, principalmente no estado do Paraná, *T. stans* passou a gerar problemas e ser considerada uma planta com potencial invasor. Encontra-se disseminada na maioria dos estados brasileiros, causando problemas de ordem econômica e ambiental por deslocar espécies nativas (RENÓ et al., 2007).

É descrita com planta invasora muito agressiva e de difícil controle, sendo um dos maiores problemas no norte do Paraná e na região da Serra Gaúcha (SILVA et al., 2008).

Sendo citada também com espécie invasora em Unidades de Conservação Federais do Brasil (SAMPAIO & SCHMIDT, 2013).

Em mudas produzidas em viveiros florestais, segundo Auer (2001) a espécie pode ser atacada pelo fungo *Prospodium appendiculatum* causando ferrugem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem das Sementes e local dos Ensaios

As sementes das espécies florestais analisadas foram obtidas através de coleta em matrizes localizadas no município de Seropédica (RJ) e através de doação do Banco de sementes do Viveiro Florestal Luiz Fernando Oliveira Capellão do Departamento de Silvicultura do Instituto de Florestas da UFRRJ (Tabela 1), sendo os lotes armazenados em câmara fria até a realização dos testes.

Todos os testes de sanidade foram realizados no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ (L.O.D.F.), credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para análise de fungos, procariotos, nematóides, vírus e viróides em produtos de origem vegetal.

Tabela 1: Espécies florestais cujas sementes foram analisadas quanto à sanidade no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ.

Espécie	Nome Popular	Família	Origem das Sementes
<i>Cassia fistula</i> L.	Chuva de Ouro	Fabaceae	Viveiro (2015)
<i>Pseudosamanea guachapele</i> (Kunth) Dugand.		Fabaceae	Coleta (2016)
<i>Tecoma stans</i> L. Juss. ex Kunth	Ipê-de-jardim	Bignoniaceae	Viveiro (2015)

3.2. Detecção, identificação e cultivo *in vitro* dos fungos associados às sementes

3.2.1. Teste de incubação em substrato de papel (Teste de *Blotter Test*)

A detecção dos fungos associados às sementes foi realizada através do Teste de *Blotter Test*. Foram adotados dois tratamentos, utilizando amostras de 200 sementes divididas em quatro repetições de 50 sementes. O primeiro tratamento, com sementes assépticas (SA), envolveu uma fase de assepsia, com hipoclorito de sódio a 0,25%, por um minuto durante a

realização do teste de sanidade, enquanto que para o outro tratamento com sementes não assépticas (SNA) não foi realizada desinfestação prévia.

A condução do Teste de *Blotter Test* foi realizada em Capela de Fluxo Laminar e a metodologia adaptada do Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes foram incubadas em caixas de plástico transparente do tipo Gerbox, preenchidas com água destilada e esterilizada, durante um período de 15 minutos. Após essa fase retirou-se o excesso de água com uso de peneira e procedeu-se a desinfestação das sementes imergindo em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,25% por um minuto no caso do tratamento com sementes assépticas (AS), e posterior lavagem com água destilada e esterilizada, enquanto as sementes submetidas ao tratamento sem assepsia (SNA) suprimiu-se a etapa de hipoclorito de sódio.

Na etapa seguinte as sementes foram dispostas individualmente de maneira equidistantes sobre uma camada de papel filtro umedecido (três folhas sobrepostas) em caixas do tipo Gerbox, contendo 50 sementes cada, e incubadas em estufa B.O.D. a temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, regime de luminosidade de 12 horas de luz fluorescente e 12 horas de escuro durante sete dias.

3.2.2 Avaliação da incidência fúngica nas sementes

Após a incubação procedeu-se o exame individual de cada sementes com auxílio de Microscópio Estereoscópico através da observação de estruturas fúngicas e da contagem de sementes contaminadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de incidência para cada espécie fúngica.

Para análise do efeito da desinfestação prévia das sementes com hipoclorito de sódio a 0,25% por um minuto adotou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, os dados em porcentagem foram transformados em $\arcsin\sqrt{(x/100)}$, submetidos a Análise de Variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do *software* de Análise Estatística SISVAR.

3.2.3. Identificação em Microscópio Estereoscópico e Ótico

Foram confeccionadas lâminas com fragmentos retirados dos fungos e a identificação foi realizada através da análise dos caracteres morfológicos relacionados aos fungos observados nas amostras e correlacionados com os dados taxonômicos disponíveis na literatura.

3.2.4. Isolamento de fungos fitopatogênicos

Fragmentos dos fungos potencialmente fitopatogênicos foram transferidos para placas de petri contendo meio de cultura BDA (batata - dextrose - agar pH 7,0). As placas foram incubadas no escuro, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de dez dias. Para obtenção de cultura pura do fungo, as pontas de hifas foram transferidas para tubos de ensaio com meio de cultura BDA e armazenadas a 4°C para uso posterior.

3.2.5. Polymerase chain reaction (PCR)

Para a extração do DNA fúngico foi utilizado o *Redextract-N-AMPTM Plant PCR Kit* (SIGMA) segundo instruções do fabricante seguido da reação de PCR, no Termociclador: PTC 200, com os *primers* ITS1 e ITS4, na seguinte programação: 94°C / dois minutos; 35 ciclos de 94°C por dois minutos, 70°C por 40 segundos e 72°C por um minuto; 72°C por cinco minutos; 4°C por cinco minutos.

O fragmento amplificado foi observado em Transiluminador de Luz Ultravioleta após a eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio.

3.3. Teste de patogenicidade para fungos potencialmente fitopatogênicos

Os fungos identificados como potencialmente fitopatogênicos foram utilizados no teste de patogenicidade em mudas sadias da espécie florestal obtidas no Viveiro Florestal Luiz Fernando Capellão.

A inoculação foi realizada através do contato do tecido vegetal com micélio fúngico. Com auxílio de espátula esterilizada, coletou-se blocos do meio de cultura contendo o fungo, que foram depositados sobre as folhas, em seguida procedeu-se uma picada com estilete esterilizado promovendo o contato do micélio fúngico com o tecido vegetal. Para o controle repetiu-se o procedimento utilizando meio de cultura BDA sem a presença do fungo. Em seguida as mudas foram cobertas com saco plástico escuro e mantidas em casa de vegetação durante dez dias. Após esse período procedeu-se a avaliação.

As folhas inoculadas que desenvolveram sintomas foram depositadas em camadas de papel filtro umedecidos (três folhas sobrepostas) em caixas do tipo Gerbox e mantidas fechadas sobre bancada durante cinco dias. Após esse período retirou-se pedaços do tecido necrosado, desinfestou-se com solução de NaClO e procedeu-se o reisolamento em meio de cultura BDA para posterior identificação do agente em Microscópio Estereoscópico e Ótico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fungos associados às sementes das espécies *Cassia fistula*, *Pseudosamanea guachapele* e *Tecoma stans*.

Foram detectados seis fungos associados às sementes das espécies florestais analisadas (Tabela 2): *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp.

Tabela 2: Incidência de fungos nas sementes de *Cassia fistula*, *Pseudosamanea guachapele* e *Tecoma stans* após o Teste de Blotter Test. SA - sementes desinfestadas previamente com NaClO a 0,25% por um minuto e SNA - sementes sem desinfestação prévia com NaClO a 0,25% por um minuto.

Espécie		Incidência fúngica (%)					
		<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Cassia fistula</i>	SA	16,0 a		0,0 a	11,0 a	13 a	1,0 a
	SNA	18,0 a		1,0 a	9,0 a	51 b	5,0 a
<i>Pseudosamanea guachapele</i>	SA	8,0 a		1,0 a	4,0 a	5,5 a	0,0 a
	SNA	32,5 a		37,5 b	0,0 a	35,0 b	14,0 b
<i>Tecoma stans</i>	SA	0,0 a	1,0 a		0,0 a	0,0 a	1,0 a
	SNA	3,0 a	6,0 a		7,0 b	2,0 a	6,0 a

Os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Rhizopus* sp. foram detectados nas sementes das três espécies botânicas estudadas, *Chaetomium* sp. ocorreu nas amostras de *P. guachapele* e *C. fistula* enquanto que *Alternaria alternata* foi encontrada apenas no lote de *T. stans*. Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus* estão entre os fungos mais comuns encontrados em sementes de espécies florestais (SANTOS, 2000).

De um modo geral, o tratamento das sementes com NaClO demonstrou resultados variáveis conforme o fungo e a espécie estudada. Observa-se na tabela 2 que alguns fungos foram detectados apenas quando não procedeu-se a desinfestação (SNA), enquanto que *Fusarium* sp. em sementes de *Pseudosamanea guachapele* só foi observado em sementes assépticas (SA) porém, para a maioria destas, o uso de NaClO não reduziu significativamente a ocorrência fúngica.

Nota-se que, mesmo com a realização da assepsia prévia com NaClO a 0,25% por um minuto houve contaminação. Segundo Botelho et al. (2008) alguns fatores como a localização do fungo, a condição em que se encontra a semente, tempo de imersão e concentração do produto utilizado podem ser determinantes na eliminação total de alguns fungos.

Para Coutinho et al. (2000), a presença de microrganismos localizados em tecidos externos, como tegumento e pericarpo, é uma das principais formas de associação, sendo então, o tratamento das sementes com hipoclorito de sódio eficiente na redução destes quando se encontram superficialmente.

Alguns estudos demonstram um efeito positivo do uso de NaClO para redução de algumas espécies fúngicas. A combinação de álcool a 70% por um minuto seguida com NaClO a 2% por três minutos, reduziu a incidência do fungos detectados nas sementes de ipê rosa [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl.] e ipê-amarelo [*Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl.] além de refletir em maior percentual de germinação e menor percentual de plântulas com lesões (SOUZA et al., 2012).

Já para a espécie paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), segundo Oliveira et al. (2012), além da redução da contaminação fúngica, a assepsia prévia das sementes com hipoclorito de sódio a 1,5% por cinco minutos favoreceu a avaliação do teste de sanidade e não influenciou a emergência das plântulas sendo então benéfico ao estabelecimento das mudas.

As análises do Teste de *Blotter Test* com diferentes espécies conduzidas no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ demonstram que imersão das sementes em NaClO a 0,25% durante um minuto é eficiente na redução superficial dos fungos, auxiliando na detecção de espécies fitopatogênicas. Tais observações demonstram que são necessários estudos complementares, que além de envolver concentrações do produto e/ou tempos de imersão diferentes dos adotados nesse estudo, possam também avaliar o efeito na germinação das sementes.

As maiores incidências foram observadas com os fungos *Penicillium* em *C. fistula* (51%) e *P. guachapele* (35%) e *Chaetomium* para esta última em 37,5%. Espécies do gênero *Penicillium* são constantemente reladas em teste de detecção de fungos em sementes de espécies florestais. Segundo Vechiato & Parisi (2013) os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais representantes do grupo de fungos de armazenamento, invadindo as sementes após o período de colheita e podendo causar danos como deterioração e podridão de sementes, principalmente quando as sementes apresentam teor de umidade em torno de 25 %.

O autor ainda destaca a presença de *Aspergillus* sp. como indicador da deterioração das sementes e grãos, podendo crescer com menor teor de umidade, seguindo-se, após a contaminação, por *Penicillium* sp., cuja necessidade por umidade é mais elevada, desenvolvido em função da atividade metabólica dos primeiros invasores.

Segundo Lucca filho et al. (1995), *Penicillium* sp. pode causar danos como perda de germinação, descoloração das sementes, aumento da taxa de ácidos graxos, aquecimento da massa de sementes e produção de toxinas. A presença dos fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. influenciam na produção final de mudas em consequência das perdas pelo apodrecimento de sementes (CHEROBINI et al., 2008).

Ambos os gêneros fúngicos tem sua ocorrência controlada pelas condições de armazenamento, principalmente pelo teor de umidade, isso evidencia a importância da secagem das sementes como auxílio no controle da incidência de fungos. Além das condições de armazenamento, o tempo também é um fator importante na ocorrência desses fungos, Freitas et al. (2000), concluiu que em sementes de algodoeiro os percentuais de infecção por *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. tiveram um aumento linear, ao longo do período armazenado.

Os gêneros *Chaetomium* e *Rhizopus* também são classificados como fungos de armazenamento, ambos podem ser causadores de danos como deterioração de sementes dependendo dos fatores ambientais presentes no armazenamento e das condições físicas e fisiológicas das sementes (RUIZ FILHO et al., 2004).

Estudando a qualidade de sementes de espécies florestais, Carneiro (1990) observou que espécies de *Chaetomium* são capazes de causar mumificação de sementes através da produção de enzimas celulolíticas que degradam a parede celular das mesmas. Tal fungo foi detectado em 1% das sementes de *C. fistula* não desinfestadas e chegou a 37,5 % quando não se procedeu ao tratamento prévio com NaClO.

Rhizopus sp. foi comum nas três espécies florestais, espécies desse gênero são tidas como problemáticas em testes de sanidade em laboratório, isso decorre do fato de que, apresentando rápido crescimento e não ficando localizado apenas nas sementes, espécies de *Rhizopus* (Figura 1A) se espalham sobre outras sementes podendo mascarar a presença de outros fungos (CARVALHO & MUCHOVEK, 1991).

O fungo *A. alternata* e *Fusarium* sp. são classificados como fungos de campo, sendo ambos potencialmente patogênicos para essências florestais.

Fusarium sp. (Figura 1B) tem sido relatado como um problema comum em sementes de espécies florestais causando problemas radiculares e tombamento em pré ou pós-emergência de plântulas (SANTOS et al., 2011). Vechiato e Parisi (2013) destacam as espécies desse gênero, *F. oxysporum* e *F. solani*, como agentes causais de podridão de colo e de raízes e doenças vasculares.

Em *Cordia americana*, Walker (2016) observou que as espécies *F. acuminatum* e *F. verticillioides* são patogênicas e podem ser transmitidas pelas sementes, manifestando tombamento com apodrecimento das raízes e necrose do hipocótilo.

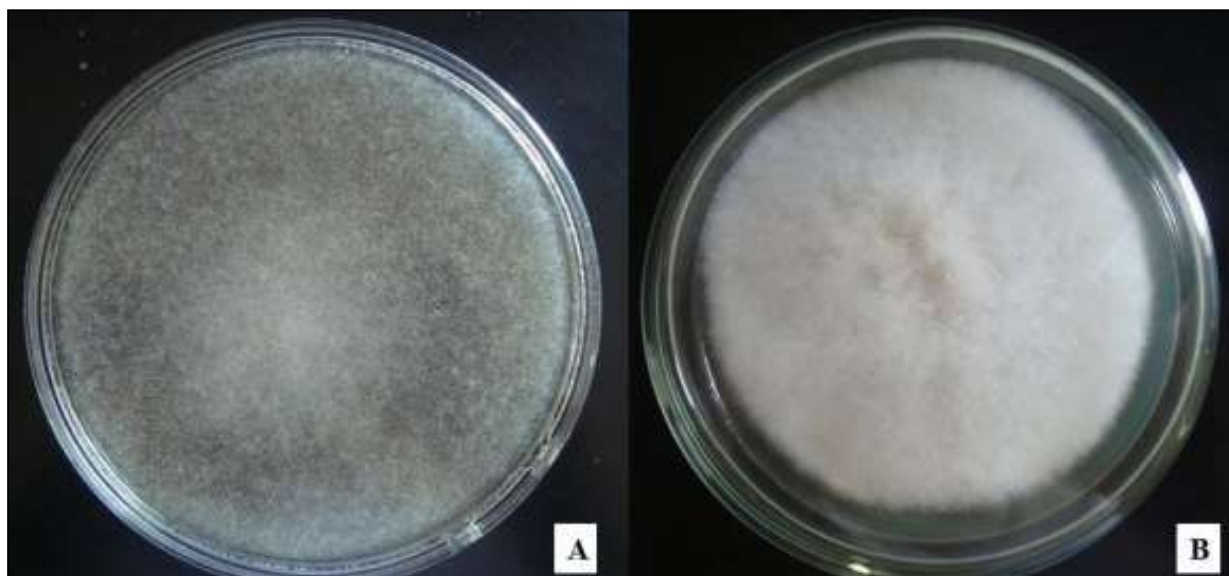


Figura 1: Isolados fúngicos de sementes de espécies florestais. A – *Rhizopus sp.* detectado em sementes de *Tecoma stans*; B - *Fusarium sp.* detectado em sementes de *Pseudosamanea guachapele*.

Em espécies do gênero *Eucalyptus*, *Fusarium sp.* pode ser agente causal do tombamento de mudas, podridão de raiz e podridão de estacas (SANTOS et al., 2001). Benetti et al. (2009) constataram associação patogênica entre *Fusarium sp.* e *Cedrela fissilis* Vellozo.

De acordo com Machado (1988), a contaminação por espécies de *Fusarium* acontece nas fases de formação ou a maturação do fruto, com isso são necessários cuidados durante a colheita e no manuseio das sementes para evitar a contaminação (SANTOS et al., 2000).

O fungo *A. alternata* foi detectado apenas em sementes de *T. stans* em baixa porcentagem, espécies desse gênero são associados a doenças foliares (SAINI et al., 1989). Apenas para *A. alternata* foi realizado teste de patogenicidade em folhas de indivíduos saudáveis, por apresentar potencial desenvolvimento de doenças foliares. Para espécies de *Fusarium sp.* não foi possível a realização do teste de patogenicidade devido a disponibilidade de sementes.

4.2. Polymerase chain reaction (PCR)

Através da reação de PCR foi obtido um fragmento de 600 pb a partir do DNA extraído do isolado fúngico de *A. alternata*.

4.3. Patogenicidade de *Alternaria alternata* para *Tecoma stans*

Na avaliação do teste de patogenicidade de *A. alternata*, observou-se a presença de manchas em folhas onde houve o contato com micélio fúngico (Figuras 2C e 2D), ao passo que em folhas onde não houve inoculação não observou-se o desenvolvimento de pontos necróticos (Figura 2A e 2B).

O isolamento fúngico a partir de fragmentos de folhas inoculadas demonstrou a presença de *A. alternata* infectando internamente as folhas de *T. stans*, concluindo então que tal fungo é patogênico para esta espécie.

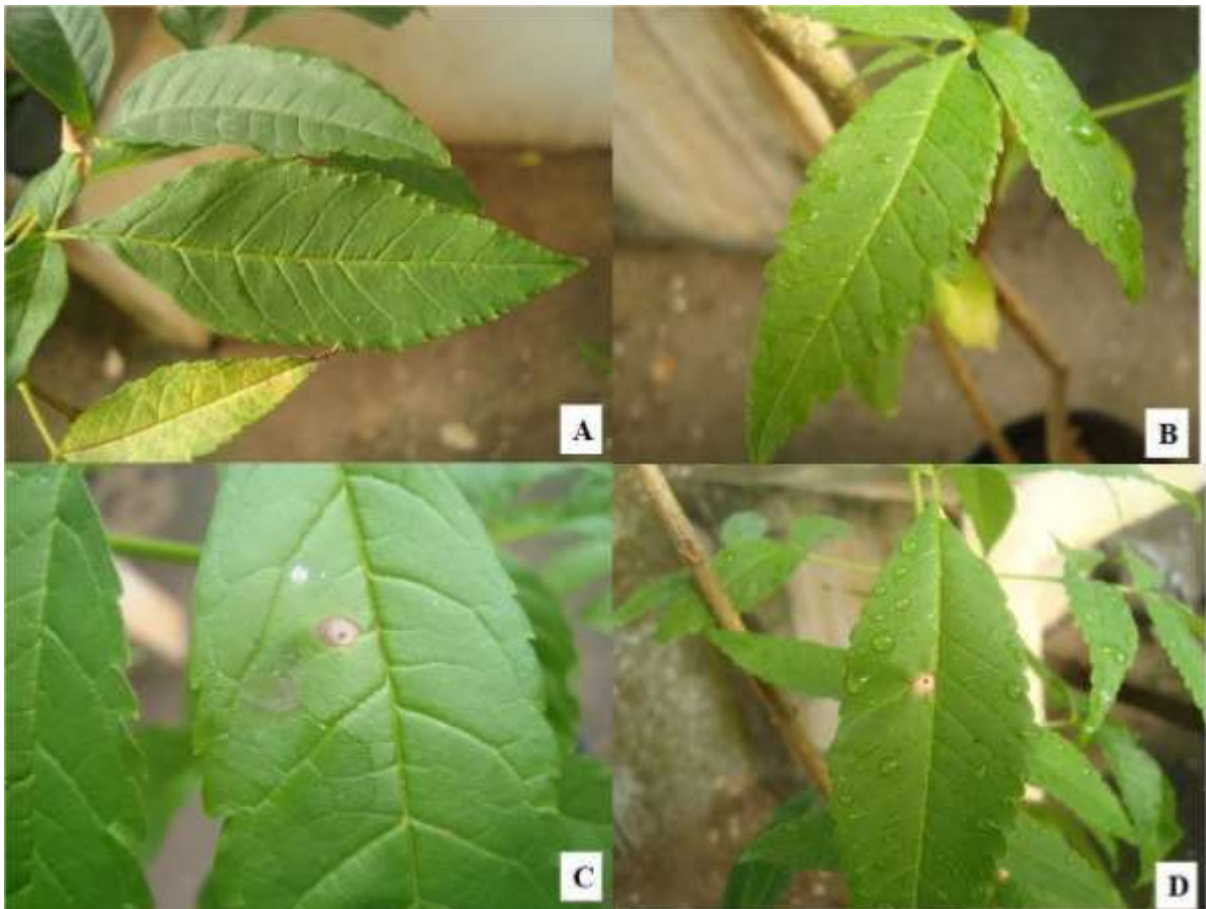


Figura 2: Teste de Patogenicidade de isolado fúngico em tecido foliar de *Tecoma stans*. A e B - Inoculação com meio de cultura BDA sem presença de fungo; C e D - Manchas foliares ocasionadas pela inoculação de *Alternaria alternata* oriunda de sementes.

Esse fungo, já foi encontrado nas sementes das espécies de ipê-amarelo [*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich.] e ipê-roxo [*Tabebuia impetiginosa* Mart. Ex DC.) Standl.], causando necrose e/ou manchas escuras nos primeiros pares de folhas, hipocótilo e epicótilo (BOTELHO et al., 2008).

A incidência e confirmação da patogenicidade desse fungo para *T. stans*, sendo o primeiro relato de patogenicidade para esta espécie, além da detecção de *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. demonstra a importância da detecção de fungos associados a sementes de espécies florestais. Como afirma Santos et al. (2015), o conhecimento da microflora associada as sementes, do seu potencial patogênico, de sua capacidade de causarem doenças em plântulas e darem início a epidemia são importantes devido aos possíveis danos que tais microrganismos podem gerar.

5. CONCLUSÕES

Nas sementes das espécies estudadas, amostradas no período de 2015 e 2016, foram detectados os fungos de armazenamento *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. e os fungos de campo *Alternaria alternata* e *Fusarium* sp. no teste de *Blotter Test*.

Aspergillus sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. foram comuns para as três espécies botânicas estudadas, *Chaetomium* sp., foi identificado nas sementes de *Cassia fistula* e *Pseudosamanea guachapele*, enquanto que *Alternaria alternata* ocorreu apenas no lote de *Tecoma stans*.

A desinfestação das sementes com Hipoclorito de Sódio (NaClO) a 0,25 % por um minuto não foi eficiente para a redução da maioria dos fungos detectados.

O fungo *Alternaria alternata* foi patogênico para a espécie *Tecoma stans* manifestando sintoma de manchas foliares, sendo o primeiro relato de patogenicidade do fungo para ipê-dejardim.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUER, C. G. **Doenças em Ipês: Identificação e Controle**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001, p. 01-16 (documento 67).
- BALIEIRO, F.C.; FRANCO, A.A.; FONTES, R.L.F.; DIAS, L.E.; CAMPELLO, E.F.C.; FARIA, S.M. Through falland stem flow nutrient contents in mixed and pure plantations of *Acacia mangium*, *Pseudosamanea guachapele* and *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.2, p.339-346, 2007.
- BALIERO, F. C.; FRANCO, A. A.; PEREIRA, M. G.; CAMPELLO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M.; ALVES, B. J. R. Dinâmica da serapilheira e transferência de nitrogênio ao solo, em plantios de *Pseudosamanea guachapele* e *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.6, p.597-601, 2004.
- BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C. Introdução a patologia de sementes e testes convencionais de sanidade de sementes para a detecção de fungos fitopatogênicos. **Informativo Abrates**, v. 20, n. 03, p. 74-75, 2010.
- BENETTI, S. C.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; JACCOUD-FILHO, D. S. Levantamento de fungos em sementes de Cedro a avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. **Pesquisa florestal Brasileira**, Colombo, v. 34, n. 58, p. 8185, 2009.
- BOSCARDIN, J.; COSTA, E. C.; GARLET, J.; MURARI, A. B. Danos de *Pygiopachymerus lineola* (chevrolat, 1871) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em sementes de chuve-de-ouro (*Cassia fistula* L.) utilizadas na arborização urbana de Santa Maria, RS. **Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 07, n. 04, p. 09-15, 2012.
- BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 04, p.343-348, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009.
- 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.386-394.
- CARNEIRO, L.S. Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paraopeba, MG. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.1, p.75-77, 1990.
- CARVALHO, W. L.; MUCHOVEJ, J. J. Fungos associados às sementes de essências florestais. **Revista Árvore**, v. 15, n. 2, p. 173-178, 1991.
- CHEROBINI, E. A. I.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2008.

- CIPRIANI, A. F.; KAPLAN, M. A. C.; ISAIAS, R. M. S.; SOARES, G. L. G. Avaliação da Fitotoxidez de *Tecoma stans* (L.) Kunth. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 01, p. 01- 07, 2014
- CORDERO, J.; BOSHIER, D. H. **Arboles de Centroamérica**: um Manual para Extensionistas Campinas: Fundação Cargill, 2003. p. 386-394.
- COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A.; MACHADO, J. C.; FREITAS-SILVA, O.; PENA, R. C. M.; MAGALHÃES, F. H. L. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.3, p.552-555, 2000.
- FERRAZ, F. C.; CARVALHO, A. G. Ocorrência e danos por *Pygiopachymerus lineola* (Chevrolat, 1871) (Coleoptera: Bruchidae) em frutos de *Cassia fistula* L. no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Revista Biotemas**, v. 14, n. 01, p. 137140, 2001.
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.
- FREITAS, R. A.; DIAS, D. C. F. S.; CECON, P. R.; REIS, M. S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 02, p. 94-101, 2000.
- FREIXO, A. A.; FADIGAS, F. S.; FREIRE, M. O; BALDANI, V. L. D. Quantificação de microorganismos em solos sob plantio puro de *Pseudosamanea guachapele* (Kunth.) Harms em consórcio com *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Embrapa Agrobiologia**, 2000, p. 01-08 (documento 39).
- FROUFE, L. C. M. **Decomposição de serapilheira e aporte de nutrientes em plantios puros e consorciados de *Eucalyptus grandis* Maiden, *Pseudosamanea guachapele* Dugand e *Acacia mangium* Willd.** Seropédica, 1999 Dissertação (Mestrado), UFRRJ.
- GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; SANTOS-MOURA, S. S.; COSTA, E. G.; MELO, P. A. F. R. Tratamentos para superar dormência de sementes de *Cassia fistula*L.. **Revista Biotemas**, v. 26, n. 04, p. 11-22, 2013.
- GEILFUS, F. **El árbol al serviciodel agricultor. Manual de agroforestéria para el desarrollo rural**. Guia de especies, CATIE, Turrialba, C.R. 1989. 776p.
- KRANZ, W. M.; PASSINI, T. **Amarelinho – Biologia e controle**. Informe da Pesquisa, Londrina, n. 121, maio, 1997.
- LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; MACIEL, C. G.; LONGHI, S. J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrelafissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Viçosa, v. 22, n. 03, p. 493-503, 2012.
- LORENZI, H. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2.ed.Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 1088p.
- LUCCA FILHO, O. A. 1995. **Curso de Tecnologia de Sementes**. Brasília: ABEAS. 53 p.
- LUCCA FILHO, O. A. **Patologia de sementes**. In: PESKE, S. T.; LUCCA FILHO, O. A.; BARROS, A. C. S. A. Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos. 2 ed. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 2006. p. 259-330.
- LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; SOOBRAATTEE, M. A.; ARUOMA, O. I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 18, p. 5042-5047, 2002.
- MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC- ESAL-FAEPE, 1988. 106 p.

- MACIEL, C. G.; FERRERA, T. S.; BOVOLINI, M. P.; BRUM, D. L.; GONZATTO, R.; MUNIZ, M. F. B.; BURIOL, G. A. Transmissão de fungos via semente e patogenicidade de *Pestalotiopsis* sp. em mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 01, p. 2767-2774, 2012.
- MACIEL, C. G.; SOUZA, L. B.; BOVOLINI, M. P.; BRUM, D. L.; MUNIZ, M. F. B. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açoita-cavalo (*Luehea adivaricata*). **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo v. 33, n. 75, p. 331-338, 2013.
- MENDES, S. S.; MESQUITA, J. B.; MARINO, R. G. Qualidade sanitária de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit armazenadas em câmara fria. **Natural Resources**, Aquidabã, v.1, n.1, p.15 22, 2011.
- OLIVEIRA, J. D.; SILVA, J. B.; DAPONT, E. C.; SOUZA, L. M. S.; RIBEIRO, S. A. L. Métodos para detecção de fungos e assepsia de sementes de *Schizolobiumamazonicum* (Caesalpinioideae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 945-953, 2012.
- PESTANA, L. T. C.; ALVES, F. M.; SARTORI, A. L. B. Espécies arbóreas da arborização urbana do centro do município de campo grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **REVSBAU**, Piracicaba, v.6, n.3, p.01-21, 2011.
- PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B.; REINIGER, L. R. S.; DUTRA, C. B; PACHECO, C. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de aroeira-preta (*Lithraeamolleoides*) submetidas a métodos de superação de dormência. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 02, p. 289297, 2014.
- RENÓ, L. R.; MOSCHETA, I. S.; BRACCIN, A. S. L. Morfo-anatomia do fruto e semente de amarelinho (*Tecoma stans* (L.) Kunth - Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n. 03, p. 18-30, 2007.
- RUIZ FILHO, R. R.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; JACCOUD FILHO, D. S. Fungos associados às sementes de cedro. **Summa Phytopathologica**, v.30, n. 04, p.494496, 2004.
- SAMPAIO, A. B.; SCHMIDT, I. B. Espécies Exóticas Invasoras em Unidades de Conservação Federais do Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 03, n. 02, p. 32-49, 2013.
- SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; SANTANA, D. L. Q. Fungos associados às sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica. *Bol. Pesq. Fl.*, Colombo, n. 42, p. 57-70, 2001.
- SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de sementes florestais**. 1. ed. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 236 p.
- SANTOS, A. F.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI, J. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas, v. 30, n. 1/2, p. 119-128, 2000.
- SANTOS, A. F.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 119-128, 2000.
- SANTOS, A. F.; ECKSTEIN, B.; MUNIZ, M. F. B.; CARMO, A. L. M.; AUER, C.G.; JACCOUD FILHO, D. S.; PARISI, J. J. D. **Patologia de sementes de espécies florestais no Brasil**. In: DALIO, R. J. D. Revisão Anual de Patologia de Plantas. 1. ed. Brasília 2015. cap. 7, p.195-211.
- SILVA, J. A.; REIS, T. E. S.; REIS, L. C. Análise da infestação do amarelinho (*Tecoma stans*) na zona rural do município de Bandeirantes – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-927, 2008.
- SOUZA, A. A.; NASCIMENTO, C. R.; SILVA, A. C. D.; BARBOSA, R. N. T.; ANDRADE, J. K. C.; NASCIMENTO, J. F. Incidência de fungos associados a sementes de ipê-rosa (*Tabebuia impetiginosa*) e ipê-amarelo (*Tabebuia ochracea*) em Roraima. **Revista Agroambiente On-line**, v. 06, n. 01, p. 34-39, 2012.

- VECHIATO, M. H.; PARISI, J. J. D. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. Divulgação Técnica. **Biológico**, v. 75, n. 01, p. 27-32, 2013.
- WALKER, C.; MACIEL, C. G.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B.; MEZZOMO, R.; POLLET, C. S. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 463-473, 2016.