

Comunicado Técnico 182

ISSN 1517-5030
Colombo, PR
Outubro, 2007



Detecção de *Fusarium subglutinans* em Sementes de *Pinus*

Celso Garcia Auer¹

Alvaro Figueredo dos Santos²

Introdução

A preocupação com a entrada de patógenos florestais tem sido a tônica dos programas de sanidade vegetal dos países que têm a atividade florestal como forte componente do produto interno bruto (PIB). No Brasil, não poderia ser diferente, considerando que a cultura do pínus produziu em 2005 cerca de 9 milhões de m³ de madeira serrada, predominantemente na Região Sul, fornecendo matéria-prima para várias finalidades (ANUÁRIO BRASILEIRO DE SILVICULTURA, 2006).

Quando se analisam as possibilidades de ingresso de patógenos em uma região ou país, as sementes se destacam como uma das principais e potenciais vias de ingresso (MACHADO, 2002). As sementes podem carrear os propágulos de patógenos externa e internamente. Quando internamente localizados, os microrganismos apresentam-se na forma endofítica e não são facilmente detectáveis. Por esse motivo, torna-se necessária a aplicação de técnicas específicas para a sua detecção.

Desde 2000, existe uma grande demanda por mudas e sementes de pínus em decorrência da falta futura de madeira e a retomada dos reflorestamentos. Para atender essa demanda de sementes, vários lotes têm sido importados. Essa entrada de sementes pode facilitar o ingresso de alguns patógenos exóticos e importantes para a cultura do pínus. Um desses patógenos é *Fusarium subglutinans*, ainda não registrado em espécies de *Pinus* no Brasil. Várias espécies de *Fusarium* foram associadas ao gênero *Pinus* no Brasil (VENTURA, 1999), principalmente em sementes e em tombamento de mudas (MENDES et al., 1998). Homechin et al. (1986) constataram *F. moniliforme*, *F. oxysporum* e *F. semitectum* em lotes nacionais de sementes de *P. elliotii* var. *elliotii* e *F. oxysporum* em sementes de *P. taeda*.

O presente trabalho descreve um protocolo de detecção para *Fusarium subglutinans* em sementes de pínus, baseado em trabalhos de Anderson et al. (1984) e Anderson (1986), com ligeiras modificações. O fungo *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson,

¹ Engenheiro Florestal, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. E-mail: auer@cnpf.embrapa.br

² Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. E-mail: alvaro@cnpf.embrapa.br

Toussoun & Marasas, conhecido anteriormente como *F. moniliforme* var. *subglutinans* Wollenw. & Reinking, ataca várias espécies de *Pinus* no exterior, produzindo uma doença denominada "Pitch canker" (BLAKESLEE et al., 1980) e que seria traduzida como o cancro dos pinheiros sulinos ou cancro resinoso do pínus. Essa doença ataca várias espécies de pínus, destacando-se algumas que são plantadas no Brasil como *P. elliotii*, *P. taeda*, *P. oocarpa*, e *P. maximinoi* (CROP..., 2005). A doença causa exsudação de resina no tronco e a mortalidade de árvores, pode também atuar como um patógeno de mudas (BLAKESLEE et al., 1980). O fungo encontra-se distribuído na América do Norte (EUA e México), América do Sul (Chile), Ásia (Japão e Coréia) e África (África do Sul) (CROP..., 2005). Recentemente, esse fungo foi classificado como *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (anamorfo) e *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (teleomorfo) (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998).

Metodologia

Quando o propágulo está localizado internamente, ou seja, o fungo está presente no tegumento e nos tecidos do gametófito e do embrião, o patógeno comporta-se de modo endofítico na semente. Ao se proceder a inspeção direta da semente, não existem sinais externos visíveis de infecção na sua superfície. Diante disso, são descritos dois métodos de detecção de *F. subglutinans* localizados externa ou internamente nas sementes de pínus.

1) Método do ágar

Este método implica no uso de um meio seletivo para *Fusarium* preparado com 15 g de peptona, 5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de KH_2PO_4 , 1 g de PCNB (pentacloronitrobenzeno) e 20 g de ágar em 1.000 mL de água destilada (ANDERSON, 1986). Este meio deve ser suplementado com os antibióticos sulfato de estreptomicina (1 g/L) e sulfato de neomicina (1g/L), em ágar fundente antes de ser vertido em placas de Petri.

As sementes de pínus não desinfestadas são esmagadas com uma pinça ou bastão esterilizados e colocadas sobre a superfície do meio seletivo (Figura 1A). As placas de Petri são incubadas a 20 °C, sob luz fluorescente, em fotofase de 12 h, por 14 dias. Este período é suficiente para as colônias fúngicas atingirem cerca de 2 cm em diâmetro e poderem ser examinadas (Figura 1B).

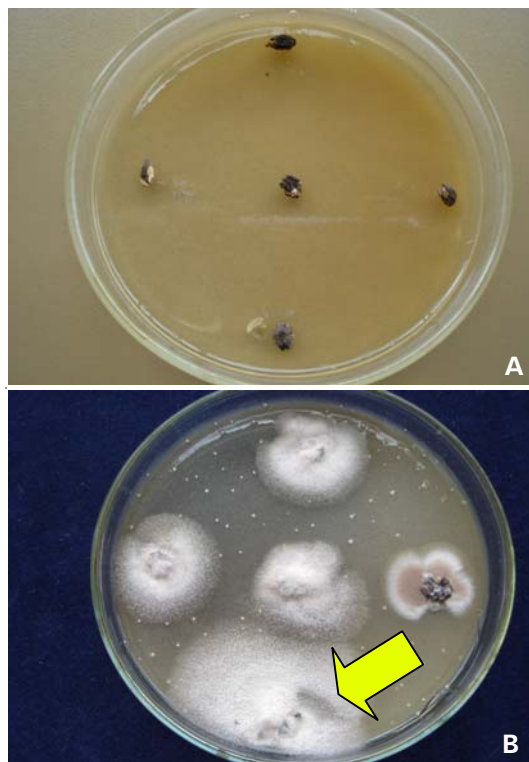


Figura 1. Visualização do método de detecção de *Fusarium* sp. em sementes de *Pinus taeda* em ágar. A. Sementes recém-esmagadas e plaqueadas. B. Presença das colônias de *Fusarium* sp. (seta).

Para a identificação do fungo, prepara-se uma lâmina com fragmentos de micélio-ágar e observa-se em microscópio ótico. *F. subglutinans* é caracterizado pela presença de polifíalides, microconídios e macroconídios.

Esse meio seletivo restringe o crescimento da maioria dos fungos que não pertençam ao gênero *Fusarium*. Entretanto, várias espécies de *Fusarium* e alguns outros fungos crescerão sobre o substrato. Por este motivo, a observação das lâminas no microscópio ótico é necessária para a identificação positiva. Se as colônias apresentarem microconídios em cadeias e em forma de pêra ou clamidósporos, essas não são classificadas como *F. subglutinans*, mesmo com a presença de polifíalides.

2) Método do papel de filtro

Para esse método, um caldo nutritivo (15 g de peptona, 5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de KH_2PO_4 , 1 g de PCNB (pentacloronitrobenzeno) em 1.000 mL de água destilada) é vertido sobre uma folha de papel cartão de cor azul e esterilizado, em quantidade suficiente para saturar a folha de papel. A coloração azul do papel facilita a rápida visualização das colônias esbranquiçadas de *F. subglutinans*. Em seguida, o papel cartão umedecido com o caldo nutritivo é colocado em

caixas de plástico gerbox, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1 %.

As sementes de pínus não desinfestadas são individualmente esmagadas sobre uma superfície de vidro esterilizado com uma pinça ou bastão esterilizado. Posteriormente, as sementes são colocadas sobre o papel cartão umedecido com o caldo nutritivo. As caixas de plástico gerbox são incubadas a 20 °C, sob luz fluorescente, em fotofase de 12 h, por 14 dias. Este período é suficiente para as colônias fúngicas atingirem cerca de 2 cm em diâmetro (Figura 2).

A avaliação deve ser realizada da mesma forma utilizada para o método de ágar.

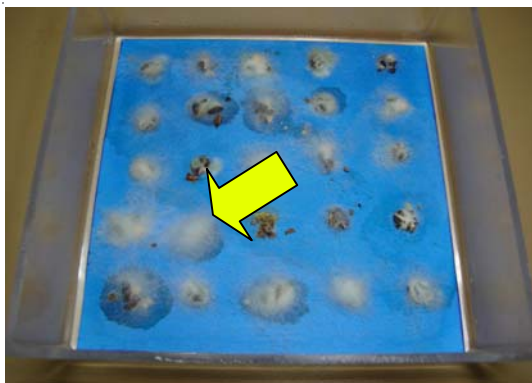


Figura 2. Detecção de colônias de *Fusarium* sp. (seta) em sementes de *Pinus taeda* pelo método do papel de filtro com caldo nutritivo.

Considerações Finais

De acordo com as regras de análise de sementes (BRASIL, 1992), devem ser analisadas 400 sementes por amostra, a menos que o lote de sementes a ser avaliado seja composto de uma quantidade menor. Nesse caso, poderiam ser analisadas um mínimo de 100 sementes por amostra.

Analisando os dois métodos, verifica-se que o método do papel de filtro é mais rápido e mais barato do que o método em ágar. Outro aspecto a ser ressaltado é que, apesar do uso de antibióticos, o surgimento de colônias bacterianas pode ocorrer no meio agarizado, impedindo o crescimento das colônias de *Fusarium* spp. Por outro lado, o método em ágar permite que as culturas tenham um período de tempo maior para produzir estruturas fúngicas que ajudem na sua identificação. Para maior eficácia, recomenda-se que os dois métodos sejam usados conjuntamente.

Para facilitar a identificação de *F. subglutinans*, as colônias são de crescimento lento e têm aspecto esbranquiçado e granular.

Referências

- 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.
- ANDERSON, R. L.; BELCHER, E.; MILLER, T. 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.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE SILVICULTURA 2006. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2006. 136 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para a análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.
- BLAKESLEE, G. M.; DWINELL, L. D.; ANDERSON, R. L. **Pitch canker of southern pines: identification and management considerations**. Atlanta: USDA, Forest Service, Southeastern Area, State & Private Forestry, 1980. 15 p. (USDA. For. Serv. Forestry Report SA-FR, 11).
- CROP protection compendium: datasheet: *Gibberella circinata*. Disponível em: <<http://www.cabicompendium.org/cpc/datasheet.asp?CCODE=GIBBBP&COUNTRY=0>>. Acesso em: 25 maio 2005.
- 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**, Piracicaba, v. 12, n. 1/2, p. 102-112, 1986.
- MACHADO, J. C. Concept and grouping fungi in relation to seed health testing: an overview. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. (Ed.) **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**. Bassersdorf: International Seed Testing Association, 2002. p. 9-18.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L. da; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N. dos; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 569 p.
- NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.
- VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I - história, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 271-298, 1999.

**Comunicado
Técnico, 182**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Endereço: Estrada da Ribeira Km 111, CP 319

Fone / Fax: (0**) 41 3675-5600

E-mail: sac@cnpf.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2007): conforme demanda

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

**Comitê de
Publicações**

Presidente: *Luiz Roberto Graça*

Secretária-Executiva: *Elisabete Marques Oaida*

Membros: *Álvaro Figueredo dos Santos,
Edilson Batista de Oliveira, Honorino R. Rodigheri,
Ivar Wendling, Maria Augusta Doetzer Rosot,
Patrícia Póvoa de Mattos, Sandra Bos Mikich,
Sérgio Ahrens*

Expediente

Supervisão editorial: *Luiz Roberto Graça*

Revisão de texto: *Mauro Marcelo Berté*

Normalização bibliográfica: *Elizabeth Câmara Trevisan,
Lidia Woronkoff*

Editoração eletrônica: *Mauro Marcelo Berté*