

<https://eventos.utfpr.edu.br//sicite/sicite2019>

## Diferença comparativa de métodos de detecção de patógenos em sementes de *Bauhinia forficata*

### Comparative difference of pathogen detection methods in *Bauhinia forficata* seeds

#### RESUMO

As espécies florestais ainda são pouco pesquisadas, dentro dos problemas fitossanitários o acometimento por doenças é uma das principais causas de perdas produtivas em geral. O trabalho utilizou 8 tratamentos instalados em caixas gerbox e em placas de petri. Os tratamentos foram: *Blotter test* com desinfestação (7 e 15 dias de incubação), *Blotter test* sem desinfestação (7 e 15 d de incubação), *Blotter test* restrição hídrica (15d de incubação), meio B.D.A (7 e 15d de incubação) e meio B.D.A C com restrição hídrica (15d de incubação). Nos tratamentos com sanitização utilizou-se hipoclorito de sódio 1% por 1min e após a incubação em B.O.D. foram levantados os fungos presentes com a utilização de lupa e microscópio. Os dados obtidos foram processados pelo programa ASSISTAT BETA organizados em delineamento DIC a 5% em Kruskal-Wallis onde concluiu-se que para *B. forficata* o método mais adequado foi *Blotter test* quinze dias de incubação com restrição hídrica. O objetivo do presente trabalho foi identificar a metodologia e o tempo de incubação mais adequado para a quantificação de patógenos em sementes de *B. forficata*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sementes Nativas. Ecologia. Fitopatologia.

#### ABSTRACT

As forest species are still poorly researched, phytosanitary problems or disease is one of the main causes of productive injuries in general. The work used 8 devices installed in gerbox boxes and petri dishes. The procedures were: disinfection blotter test (7 and 15 days incubation), non-disinfection blotter test (7 and 15 days incubation), water restricted blotter test (15d incubation), BDA medium (7 and 15d incubation) and water-restricted BDA C medium (15d incubation). In hygienic procedures we used 1% sodium hypochlorite for 1 minute and after incubation in B.O.D. were raised or with fungi present using a magnifying glass and microscopy. The captured data were processed by the ASSISTAT BETA program organized in the 5% DIC design in Kruskal-Wallis, where it was tested for *B. forficata* or the most suitable method was the fifteen day *Blotter test* of incubation and previous disinfection. The objective of the present work was to identify the most appropriate methodology and incubation time for the quantification of pathogens in seeds *B. forficata*.

**KEYWORDS:** Native seeds. Ecology. Plant Pathology

**Ariadny Cristhina Sanches**  
[ariadny.sanches@hotmail.com](mailto:ariadny.sanches@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Maristela dos Santos Rey**  
[maristelarey@utfpr.edu.br](mailto:maristelarey@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Caliandra Bernardi**  
[caliandra.bernardi@hotmail.com](mailto:caliandra.bernardi@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Roberto Sadao Sinabucro Saburo**  
[robertossaburo@gmail.com](mailto:robertossaburo@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Daniele Zago**  
[daniele\\_zago@hotmail.com.br](mailto:daniele_zago@hotmail.com.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Lucas Gabriel da Silva**  
[lucassilva.1999@alunos.edu.br](mailto:lucassilva.1999@alunos.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Fernanda Spagnol**  
[fernanda.spagnol@hotmail.com](mailto:fernanda.spagnol@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

## INTRODUÇÃO

Em viveiros florestais estipula-se que 90% das doenças sejam ocasionadas por fungos (RESENDE *et al.*, 2008) podendo ser evitadas, se utilizado o manejo correto. A obtenção de mudas de qualidade é o ponto chave para se produzir plantas saudáveis, onde se pode colocar ênfase em seu insumo primário as sementes que devem possuir boa qualidade sanitária, pois esta é potencial disseminadora de patógenos (SANTOS *et al.*, 2015).

Santos *et al.* (2000) relataram que a atenção não deve ser localizada somente na semente, mesmo essa estando sadia e livre de patógenos se for semeada em substrato contaminado gera a contaminação cruzada. Os infestantes que podem estar presentes causam deterioração na semente e morte precoce de plântulas pós-emergência.

As espécies florestais apresentam grande variação no poder germinativo de suas sementes devido à diversificação ecológica existente, bem como a morfologia diversa das sementes e sanidade das mesmas (AMARAL *et al.*, 1978)

No Brasil as normativas e instruções para a aplicação de testes que quantificam qualidade nas sementes é trazida nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009) e o enfoque principal são as espécies agrícolas, assim, tendo baixa visibilidade para florestais nativas como a *Bauhinia forficata*.

A pata-de-vaca é muito estudada devido as suas propriedades medicinais (MARTINS *et al.*, 2013, p.88). Seu potencial se destaca no sul do Brasil o uso em grande demanda é feito por pessoas que necessitam de controle de hiperglicemia (SALGUEIRO, *et al.*, 2013, p.2). Pertencente à família das Fabaceas ocorre nos estados de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, sendo utilizada para lenha, ornamentação e atualmente sendo inserida em locais de recuperação por seu potencial de rápido desenvolvimento a campo. (SILVA *et al.*, 2016).

O objetivo do presente trabalho é verificar qual o melhor método e o melhor tempo de incubação para detecção de infestantes em testes de sanidade de sementes de *Bauhinia forficata*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *B. forficata* foram coletadas no município de Dois Vizinhos/PR e foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná onde foram contadas e separadas por lotes de 200 sementes.

Foram utilizados oito tratamentos englobando as metodologias e o teste de sanidade e tempos diferentes de incubação – *Blotter test*, as sementes recebidas no laboratório de fitopatologia da UTFPR foram destinadas aos testes, sendo separados em dois lotes. Lote 1(um) foi mantido em câmara do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias, e o 2 (dois) as sementes foram mantidas nas mesmas condições por um período de 15 dias.

Blotter test - Teste do papel filtro

Utilizando os lotes, separou-se 200 sementes em 8 repetições de 25 sementes que foram alocadas em caixas gerbox de modo que cada uma representava uma

repetição. As sementes foram depositadas sob três folhas de papel filtro umedecidas com 7ml de água destilada estéril.

#### Método do papel filtro com desinfestação

Para este método as sementes passaram por pré tratamento antes de instalado o do teste de sanidade.

O tratamento consistiu na imersão das mesmas em solução de hipoclorito de sódio à 1% por um minuto, sendo colocadas em papel absorvente para secagem das mesmas. Posteriormente, foram dispostas em caixas Gerbox, de acordo com a separação das repetições. Após disposição das mesmas, foi umedecido o papel com 7ml de água esterilizada, e mantidas em câmara do tipo BOD (25°C e 12 horas de fotoperíodo) pelo período específico em cada lote (7 e 15 dias).

#### Método de sanidade em meio de cultura

As sementes foram previamente tratadas com hipoclorito de sódio á 1% por um minuto, e colocadas em papel absorvente para secagem. Após a realização do tratamento, as sementes foram dispostas em placas de Petri® sob meio BDA (Batata – Dextrose – Agar) já solidificado. Posteriormente a sementes foram mantidas em câmara do tipo BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas durante os períodos específicos para cada lote de sementes (7 e 15 dias).

#### Método de sanidade por restrição hídrica:

As sementes foram distribuídas em dois testes, blotter test e meio BDA para o nível de -1Mpa NaCl (1,72g/150ml). Para o blotter test, foi pesado o papel filtro a ser utilizado nas caixas Gerbox, sendo feita a correção para umedecer em 2,5 vezes o peso do papel para cada gerbox.

Para o meio BDA, a concentração de NaCl pesada foi homogeneizada com o meio de cultura durante o preparo. Nos dois testes, as sementes ficaram armazenadas em BOD por 15 dias, em temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas sendo posteriormente avaliados.

Todos os testes após a montagem foram armazenadas a câmara tipo B.O.D. a temperatura 25°C e fotoperíodo de 12 horas (tabela1).

Tabela1. Organização dos tratamentos categorizado por metodologia.

Método	Desinfestação	Tempo	Incubação
<i>Blotter test</i> -Papel filtro	S	7/15	25°C e 12/12h
<i>Blotter test</i> -Papel filtro com desinfestação	C/S	7/15	25°C e 12/12h
Sanidade em meio de cultura	C	7/15	25°C e 12/12h
<i>Blotter test</i> -restrição hídrica	S	15	25°C e 12/12h
Sanidade em restrição hídrica-1Mpa NaCl	S	15	25°C e 12/12h

S= Sem desinfestação; C = com desinfestação

Fonte: A autora (2019).

A avaliação foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico (Lupa) observando e identificando os patógenos a partir de suas estruturas de desenvolvimento e reprodução mais abundantes.

Após a tabulação dos dados foi realizada a análise estatística no programa Assistat Beta utilizando Kruskal-Wallis a nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a incubação pelo tempo determinado de cada tratamento foi realizada a contagem e levantamento dos fungos presentes nas sementes alocando-os na tabela 2.

Tabela 2. Incidência de fungos para *B. forficata*. Dois Vizinhos, (2019).

Fungos	Métodos de detecção								
	Blotter test					Placas Petri®			
	7 dias S/D	15 dias S/D	7 dias C/D	15 dias C/D	15 dias RH	7 dias C/D	15 dias C/D	15 dias RH	
<i>Alternaria</i> sp.	2,5 ab	-	-	7 ab	4 a	-	-	-	
<i>Aspergillus</i> sp.	0,5 a	-	-	5 ab	8 ab	1 a	4 a	3 ab	
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	1 a	-	-	10 ab	
Bactéria	-	-	-	-	-	14 ab	6 a	1 a	
<i>Bipolaris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	0,5 a	3 ab	
<i>Botrytis</i> sp.	-	-	1,5 a	1 a	2 a	7 ab	-	5 ab	
<i>Chaetomium</i> sp.	-	0,5 a	-	-	4 ab	1 a	-	-	
<i>Cylindrocladium</i>	-	-	-	-	-	-	-	4 ab	
<i>Cladosporium</i> sp.	2 ab	4 ab	3 a	-	2 a	-	2 a	9 ab	
<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	22 bb	
<i>Fusarium</i> sp.	12,5 b	3,5 a	17 b	17 ab	72 b	3 ab	7,5 a	13 ab	
<i>Gibberela</i> sp.	-	-	-	1 a	-	-	-	-	
<i>Penicillium</i> sp.	2 a	41,5 b	8 ab	26 b	2 a	19 b	9 a	13 ab	
<i>Pestalotia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	2 ab	
<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	1	3 a	-	-	-	
<i>Rhizoctonia</i> sp.	-	8 ab	-	1 a	13 ab	11 ab	5 a	1 a	
<i>Rhizopus</i> sp.	15 ab	3 a	8 a	33 b	27 ab	-	-	30 ab	
<i>Stemphylium</i> s.	-	1 a	-	-	-	-	-	-	
<i>Verticillium</i> sp.	-	-	-	-	-	2 ab	-	-	

Percentagem de incidência seguidas de letras minúsculas na coluna diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade.  
S/d\* = Sem desinfestação; C/D = Com desinfestação de NaOCl 1%; R.H = Restrição Hídrica de NaCl

Fonte: A autora (2019)

Para a primeira variável- *Blotter test* com sete dias de incubação e sem desinfestação (SD) prévia das sementes, os fungos sobre as sementes foram dos gêneros *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Aspergillus* sp.

Para a segunda variável- *Blotter test* com quinze dias de incubação e sem desinfestação prévia das sementes, observou-se a presença dos fungos *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Chaetomium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Stemphylium* sp. e *Cladosporium* sp. Sendo o mais expressivo o gênero *Penicillium* sp., com presença em 41% das sementes avaliadas. Os demais apresentaram ocorrência abaixo de 8%. Os gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. são comuns em sementes florestais, quando estas são levadas do campo diretamente para o laboratório (PIÑA-RODRIGUES, VIEIRA, 1988).

O terceiro método de detecção – *Blotter test* com sete dias de incubação e desinfestação prévia das sementes apresentou incidência dos fungos dos

gêneros *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Cladosporium* sp. e *Botrytis* sp., com percentagem de incidência de 17%, 8%, 8%, 3% e 1,5% respectivamente.

Santos *et al.* (2001) avaliaram sementes de Pata de Vaca em teste de papel filtro utilizando desinfestação de Álcool 70% por 30 segundos e NaOCl 1% por dois minutos. A incubação foi realizada com luz fluorescente branca e os fungos encontrados foram *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotia* sp., *Nigrospora* sp., *Lasiodiplodia* sp. e *Chaetomium* sp., assim observa-se a semelhança nos resultados.

O quarto método de detecção – *Blotter test* com quinze dias de incubação e desinfestação prévia das sementes apresentou maior incidência dos gêneros *Rhizopus* sp. 33%, *Penicillium* sp. 26% e *Fusarium* sp. 17%. Os demais fungos *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phomopsis* sp., *Botrytis* sp. e *Giberela* sp. também encontrados apresentaram percentagem de incidência de abaixo de 7%.

O quinto método de detecção - *Blotter test* com restrição hídrica associado a quinze dias de incubação apresentou incidência de *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. e *Rhizoctonia* sp., com percentagens de 72%, 27% e 13% respectivamente, os demais encontrados apresentaram incidência abaixo de 8%.

Martinelli-Seneme *et al.* (2004) utilizando a metodologia de papel filtro, com desinfestação de NaOCl 2% por 5 min, 10 min e 20 min e Thiram (300ml por Kg de semente) encontraram os fungos *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Dendryphon* sp., *Diplodia* sp., *Fusarium moliniforme*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Rhizopus stolonife* em sementes de Pata-de-vaca.

O sexto método de detecção - Placa de Petri® com quinze dias de incubação e restrição hídrica apresentou a incidência de doze fungos e uma bactéria. Com maior percentagem de incidência *Rhizopus* sp (30%) seguido de *Colletotrichum* sp. (22%), *Fusarium* sp. (13%) e *Penicillium* sp. (13%).

O sétimo método de detecção - Placa de Petri® com sete dias de incubação e desinfestação prévia das sementes. Os fungos que mais apresentaram incidência foram *Penicillium* sp. e *Rhizoctonia* sp. e Bactéria, com percentagens de 19%, 14%, 11% respectivamente.

O oitavo método de detecção - Placa de Petri® com quinze dias de incubação e desinfestação prévia das sementes. Todos os fungos que incidiram apresentaram percentagem de incidências menores que 10% nas sementes avaliadas. Os mais presentes foram *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., e *Rhizoctonia* sp.

Como observado na tabela 2 o tratamento que foi mais efetivo na detecção de fungos para a espécie *B. forficata* foi o *Blotter test* quinze dias com restrição hídrica.

## CONCLUSÃO

A partir das informações obtidas pode-se concluir que as sementes florestais ainda são negligenciadas e a *B. forficata* necessita de incubação de 15 dias para que se obtenha resultados com maior abrangência de espécies levantadas, sendo o melhor método o *Blotter test*.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, et al. 1978. Metodização e tratamento pré-genninativo de sementes florestais. Roessleria, Porto Alegre, 2(1):40-56



BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.

MARTINELLI-SENEME, A. P. E.; SCHUTA, L.R.; VANZOLINI SEGATO, S. Germinação e sanidade de sementes de *Bauhinia forficata*. In: simposio brasileiro de patologia de sementes, 8., 2004.

MARTINS, J. D. et al. Pleiade, Foz do Iguaçu, v. 13, n. 13, p. 7-32, jan./Jun. 2013. 87 efeito protetor da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) contra diabetes mellitus induzido por aloxano em camundongos swiss. Revista Pleiade, v. 7, n. 12, p. 87-102, 2013.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; VIEIRA, J. D.. Teste de germinação. In: PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.. Manual de análise de sementes florestais. Campinas, Fundação Cargill, 1988. p. 70-86.

RESENDE, M.L.V *et al.* Manejo das doenças associadas a viveiros florestais. In: DAVIDE, A.C. & SILVA, E.A.A. (Eds). Produção de sementes e mudas de espécies florestais. Lavras: Ed. UFLA. p. 141-153. 2008.

SALGUEIRO, A. C. F *et al.* Composição Química e Avaliação dos Efeitos da Infusão de *Bauhinia forficata* em um Modelo Experimental com Eritrócitos Humanos Expostos a Elevadas Concentrações de Glicose in vitro. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 5, n. 4, 2013.

SANTOS, A.F. *et al.* Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. Floresta, 30(2): 119-12. 2000.

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

SILVA, R. F. da et al. Interference of doses of copper on growth and quality of *Bauhinia forficata* Link, I. Deed cuencia SEEDLINGS. Ciência Florestal, v. 26, n. 2, p. 647-655, 2016.