

SUZELE NOVOSSATE

FUNGOS ENDOFÍTICOS EM SEMENTES DE *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* var. *elliottii*

**CURITIBA
2006**

SUZELE NOVOSSATE

FUNGOS ENDOFÍTICOS EM SEMENTES DE *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* var. *elliottii*

**Monografia apresentada para a obtenção do
Título de bacharel em Ciências Biológicas, no
Setor de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.**

**Orientadora: Profª. Drª . Ida Chapaval
Pimentel.**

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer.

**CURITIBA
2006**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e estar sempre ao meu lado, ajudando e iluminando meu caminho.

À minha família, pelo carinho e dedicação, mamãe Jandira pela paciência e compreensão, papai Erenaldo por proporcionar meus estudos, minha irmã Daniele que sempre foi minha melhor amiga, meu irmão Eduardo que sempre está perto de mim.

Agradeço muito ao Anderson, que sem sua ajuda, apoio, dedicação e compreensão nem estaria me formando, você foi essencial.

À Prof.^a. Dr.^a. Ida Chapaval Pimentel pela orientação, experiência, incentivo, colaboração, bom humor, por ajudar a realizar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Garcia Auer por co-orientar e estar sempre à disposição para ajudar.

Às minhas amigas Vanessas Winter e Reis pela amizade, carinho e compreensão.

À Denise Menon e Patrícia Ramos pelo carinho.

À Mariana pela sua colaboração para o sucesso desse trabalho.

A todos vocês a minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
3. OBJETIVOS	07
4. MATERIAIS E MÉTODOS	07
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	07
4.2 MEIO DE CULTURA	07
4.2.1 Meio <i>Batata-Dextrose-Ágar (BDA)</i>	07
4.3 SOLUÇÕES	08
4.3.1 Solução de “Tween 80” 0,1 %	08
4.4 CORANTE E CLAREADOR	08
4.4.1 Lactofenol azul de algodão (CRUZ, 1981)	08
4.4.2 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981)	08
4.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	08
4.6 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	09
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	09
4.7.1 Técnica do microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999)	09
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
6. CONCLUSÃO	13
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – ANÁLISE QUANTITATIVA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i> E <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i>	11
TABELA 02 - ANÁLISE QUALITATIVA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i>	11
TABELA 03 - ANÁLISE QUALITATIVA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS SEMENTES DE <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i>	12

RESUMO

No presente trabalho foi estudada a presença de fungos endofíticos em sementes de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* var. *elliottii* armazenadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), no ano de 2001, foram realizados o isolamento e a identificação dos fungos endofíticos presentes nessas amostras.

De acordo com o estudo realizado e a técnica utilizada que foi a desinfecção superficial das sementes, foram colocadas 5 sementes cortadas e 5 sementes inteiras, em cada uma das 84 placas com meio, que foram incubadas em estufa à 25°C.

Após 2 semanas de incubação os fungos que apareceram nas sementes foram isolados em tubos de ensaio com meio. Na etapa seguinte foi realizado o microcultivo, onde se puderam identificar através da laminula os fungos que estavam presentes nas placas.

A partir dos resultados deste trabalho foi possível constatar que o fungo que mais infectou as sementes de *Pinus taeda* foi o *Penicillium* sp. que infectou 14 sementes inteiras e 19 sementes cortadas.

O fungo que mais infectou as sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* foi o *Aspergillus* sp. infectando 37 sementes inteiras e 34 sementes cortadas.

Palavras chaves: *Pinus taeda*, *Pinus elliottii* var. *elliottii*, fungos endofíticos, sementes.

1. INTRODUÇÃO

Todos os microrganismos que habitam o interior de um vegetal, ao menos um período do seu ciclo de vida, podem ser considerados endofíticos (AZEVEDO et al., 2000). Tais microrganismos ocupam os espaços intercelulares dos tecidos vegetais (STROBEL et al., 2001), sendo encontrados, de modo geral, nas partes aéreas das plantas, como folhas e caules, sem causar danos aparentes (AZEVEDO, 1998). Esta definição pode ser aplicada não somente aos simbioses, mutualistas ou neutros, mas também aos microrganismos patógenos latentes e inativos.

Por muitos anos o controle das fitomoléstias tem sido realizado pelo uso indiscriminado de substâncias químicas como inseticidas ou fungicidas, que atuam de forma devastadora sobre o meio ambiente deixando resíduos nos ecossistemas e na produção agrícola. O uso indiscriminado destes agroquímicos, com o passar do tempo, causa a resistência dos patógenos, sendo necessário o uso de produtos cada vez mais fortes e prejudiciais ao meio ambiente e a saúde.

O Brasil tem hoje uma área em cerca de 5 milhões de hectares de plantações de madeira de reflorestamento. Desse total, aproximadamente 2 milhões de hectares são de *Pinus*, dos quais 46 % da espécie de *Pinus taeda*. Porém, apesar de ser uma das madeiras de reflorestamento mais plantadas no país, pouco se conhece sobre as características do *Pinus taeda*, o que, muitas vezes, leva ao uso inadequado da madeira.

Atualmente, muitas pessoas que trabalham com *Pinus* não tem idéia dessa possibilidade. O problema é agravado pela grande demanda de madeira nas regiões Sul e Sudeste, que está exigindo a utilização de madeira ainda mais jovem. O ciclo normal de manejo é de 20 a 22 anos para o corte de madeiras destinadas à serraria (RUFINO, 2005).

O *Pinus elliottii* var. *elliottii*, uma espécie exótica originária dos Estados Unidos, é uma árvore que pode atingir 30 metros de altura. Sua casca sulcada e acinzentada quando jovem, torna-se marrom-avermelhada na idade adulta. No Brasil, os primeiros plantios realizaram-se em 1959. A planta tem baixa exigência nutricional o que permite seu plantio em ambientes com condições adversas, como regiões áridas, de extremo frio, topos de montanhas e solos com baixa fertilidade. Espécie de rápido crescimento, com oito anos já está em ponto de corte, possibilitando uma grande produção de madeira em curto espaço de tempo. Dela nada se perde; além da resina, que pode ser coletada durante dez anos, o tronco fornece madeira maciça para vigas, caibros, móveis, aglomerados e celulose para a fabricação de papel (Tokstok, 2005).

O pinus foi trazido das Américas do norte e central em 1956, primeiramente para a região de São Paulo, e, mais tarde, para o sul, onde a espécie apresentou boa adaptação. Na Botânica, o gênero *Pinus* é classificado como uma gimnosperma da classe das coníferas, também conhecida como “softwood” (madeira mole). As coníferas são árvores típicas de climas temperados e frios, utilizadas em larga escala na *construção civil e em diversos setores da indústria. Apesar de serem, em sua maioria, originárias do hemisfério norte, também inclui a araucária ou o pinho do Paraná, árvore típica do sul do Brasil, que teve suas reservas nativas bastante reduzidas nas últimas décadas. O pinus foi trazido ao Brasil justamente para substituir o uso de madeiras nativas, não só de Araucária, mas também das angiospermas dicotiledôneas ou “hardwood” (madeira dura), que constituem quase a totalidade das florestas tropicais (BOLETIM-UFSC, 2003)*

Estudar o *Pinus* é de grande importância, pois pode-se desvendar os valores técnicos e trazer subsídios para que as empresas produtoras, possam utilizar a floresta de melhor modo tornando-a um produto mais rentável.

A importância de se estudar fungos endofíticos para a manutenção dos sistemas agrícolas centrado no equilíbrio ecológico remete a diminuição da utilização de agrotóxicos pela presença da defesa natural conferida pelos endófitos da planta.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os microrganismos endofíticos foram inicialmente descritos por Barry em 1866 (AZEVEDO, 1998), *entretanto, somente receberam devida atenção nos últimos 20 anos onde pesquisas demonstram que estes, até então considerados neutros, ou seja, não causavam benefícios ou malefícios às plantas, desempenhavam um papel importante na proteção contra o ataque de doenças, insetos e animais herbívoros. Mais recentemente descobriu-se que os endófitos estariam também envolvidos no desenvolvimento das plantas, aumentando sua taxa de crescimento, enraizamento e resistência a estresses bióticos e abióticos (HALLMANN et al., 1997), demonstrando uma íntima relação evolutiva entre plantas e microrganismos endofíticos. Segundo STROBEL (2001) esta relação provavelmente iniciou-se, a aproximadamente 100 milhões de anos, com o surgimento das primeiras plantas na terra.*

Os organismos endofíticos destacam-se por sua importância potencial no controle natural de doenças e pragas vegetais. Fungos entomopatogênicos bastante

conhecidos e utilizados no controle biológico de insetos-pragas na agricultura são encontrados como endófitos.

A relação dos fungos endofíticos com os insetos-pragas vem sendo discutidas desde a década de 80, quando começaram a surgir, na literatura especializada, casos evidenciando o importante papel desempenhado pelos microrganismos endofíticos, no caso fungos, sobre suas plantas hospedeiras.

FUNK et al. (1983) observaram fungos protegendo a gramínea de clima temperado azevém ou raigrás (*Lolium perini*) contra lagartas do gramado.

CARROL (1995) descreve o fungo endofítico *Rhizoctonia parkeri*, freqüente em abeto ou Pinheiro de Douglas, como controlador de galhas causadas por larvas de insetos do gênero *Cantarinia* sp.. neste caso foi observado que o controle ocorreu através da produção das substâncias metabólicas que possuíam potencial inibitório para o desenvolvimento do inseto-praga.

Durante a evolução das plantas ocorreram associações mutualísticas com fungos endofíticos que promoveram adaptações relacionadas a capacidade de defesa da planta contra insetos, microrganismos e animais herbívoros através da produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos aos seus inimigos (LIU et al., 2001).

Artemisia annua, planta da família Composite, é bem conhecida por produzir um composto antifúngico denominado artemisina, que protege a planta contra fungos fitopatogênicos. LIU et al. (2001) observaram que 21 fungos endofíticos isolados de *Artemisia annua graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium graminearum*, *Gerlachia nivalis* e *Phytophthora capsici*, sugerindo que a defesa da planta seria, na verdade, decorrente da presença de fungos endofíticos.

Muscodor albus um novo fungo endofítico isolado da planta de canela (*Cinnamomum zeilanicum*) demonstrou ser capaz de inibir e matar outros fungos e bactérias pela produção de cinco tipos diferentes de compostos metabólitos voláteis (STROBEL et al., 2001).

Os fungos endofíticos destacam-se também por seu potencial biotecnológico, sendo úteis ao homem pela produção de determinadas drogas utilizadas na medicina.

Este é o exemplo do taxol, uma droga anticancerígena produzida pelos fungos endofíticos *Taxomyces andreanae*, *Pestalotiopsis microspora*, *Periconia* sp., *Tubercularia* sp. e *Trichothecium* sp., altamente utilizada na indústria farmacêutica (STROBEL, 2001).

A importância de se conhecer as populações de fungos endofíticos bem como as interações com suas plantas hospedeiras e o meio ambiente é o passo inicial para a adoção de técnicas agrícolas mais seguras, econômicas e rentáveis. Isto refere-se principalmente a manutenção do equilíbrio dos agroecossistemas. Segundo CHABOUSSOU (1987) existem provas científicas de que doenças, ataques de insetos e até mesmo viroses podem ser causadas não só pela presença de organismos, como bactérias, fungos, vírus e insetos, mas também pelo desequilíbrio biológico causado pelo manejo incorreto do solo e do meio ambiente onde a planta está inserida, o que a torna mais suscetível. À partir destas informações compreende-se que a suscetibilidade da planta a pragas e doenças também é uma questão de nutrição ou intoxicação. A planta equilibrada em crescimento vigoroso ou em descanso não se torna atrativa às pragas. Estas necessitam encontrar na planta hospedeira alimentos como aminoácidos, açúcares e sais minerais solúveis, ainda não incorporados em macromoléculas insolúveis. Tal situação ocorre quando há inibição da proteossíntese ou quando há excesso de produção de aminoácidos – o que ocorre pelo uso abusivo de adubos nitrogenados e agroquímicos.

Também segundo CHABOUSSOU (1987) o uso de agrotóxicos no combate de doenças ou pragas, pode promover posteriormente, o surgimento de outras doenças ou mesmo pragas. Os agroquímicos podem provocar modificações no metabolismo das plantas, enriquecendo os líquidos celulares, que em excesso não são incorporados a proteossíntese.

Pode-se supor também, que o uso destas substâncias agroquímicas podem possuir certo efeito a biota de microrganismos endofíticos das plantas, alterando a diversidade dos mesmos, influenciando as relações entre plantas e endófitos e diminuindo as defesas naturais das mesmas.

Historicamente tem sido comprovado que a importação e aplicação na íntegra de tecnologia de outros países, ou até mesmo entre regiões de um mesmo país, sem que haja uma etapa de adaptação, é um risco que quase sempre culmina com resultados desastrosos.

Alguns aspectos, dentro da patologia de sementes, têm exigido por parte da pesquisa nos últimos anos uma atuação mais agressiva, principalmente nos países em desenvolvimento, cuja economia depende substancialmente do setor agrícola.

A patologia de sementes tem sido, nos países desenvolvidos, um instrumento de apoio da maior significação para obtenção de acréscimos na produtividade de muitas

espécies de plantas. Por outro lado, nos países de terceiro mundo (países em desenvolvimento), o nível de tecnologia na referida área é por inúmeras razões, muito preocupante. Neste sentido, NEERGAARD & MATHUR (1980) dão destaque como prioridade de pesquisa aos aspectos descritos a seguir.

É de suma importância o conhecimento dos tipos e da frequência de microrganismos associados a sementes, levando-se em consideração o aspecto regional e a época de produção das sementes. É através deste tipo de levantamento que muitas vezes definem-se áreas apropriadas para produção de sementes de melhor qualidade.

A validade de um método de detecção de patógenos em sementes, conforme tem sido colocado, é função do objetivo do teste, em particular. A falta de conhecimentos sobre correlações entre os níveis de patógenos em sementes e o desempenho ou riscos potenciais que envolvem essa interação, tem tornado difícil o estabelecimento de métodos de detecção mais eficientes. Para que esse tipo de estudo seja conduzido é preciso que se tenha em mãos sementes com diferentes níveis de infecção ou contaminação e que sejam conduzidos experimentos integrados em diferentes regiões e épocas de plantio, de acordo com cada caso. É oportuno lembrar que é através deste tipo de estudo que se pode definir os índices de tolerância para os patógenos em questão.

Dentro deste tópico vale salientar também que a adoção de testes de sanidade em termos de rotina carece, para muitos casos, do desenvolvimento de métodos mais seletivos de detecção.

A enorme variação do comportamento de certos organismos pelos métodos de detecção atuais faz com que a identificação destes agentes seja muitas vezes dificultada e insegura. É necessário que haja uma melhor caracterização taxonômica das espécies em diferentes métodos, sendo de extrema importância o reconhecimento de certos detalhes morfológicos e hábitos de crescimento, inerentes a cada espécie de patógeno.

O conhecimento da posição do inoculo infeccioso em relação às diferentes partes da semente é importante pelo fato de que o mesmo permite não só definir o método de detecção, como também orientar o tipo de tratamento de sementes e estimar o padrão de doença que pode resultar no campo de cultivo. A pesquisa precisa, portanto, esclarecer para cada caso a localização preferencial do patógeno na semente hospedeira.

Um dos sérios problemas revelados pelos atuais testes de sanidade diz respeito à ausência de quantificação dos inóculos infecciosos em casa semente examinada. Do ponto de vista epidemiológico isto pode ter reflexos desastrosos. Por exemplo, para um mesmo tipo de patógeno e espécie de semente, um nível de 50 % de ocorrência do

referido patógeno pode ser menos danoso à cultura do que o nível de 10 %, em situações em que a quantidade de inóculo ativo no lote com índice mais baixo seja maior por semente.

O estudo das causas de anormalidades de sementes ou de plântulas durante os testes de germinação em laboratório deve envolver princípios de patologia e fisiologia de sementes de maneira integrada.

Uma vez sabendo-se que tanto microrganismos como fatores abióticos podem causar distúrbios fisiológicos e morfológicos muitas vezes semelhantes, é inadmissível que neste tipo de estudo esses aspectos não sejam considerados conjuntamente.

Em se tratando da detecção de um organismo ainda não relatado na literatura, em relação à determinada espécie de semente, é importante definir-se o grau de relacionamento deste agente com o hospedeiro em questão. É recomendável que nesse tipo de estudo diferentes níveis de qualidade fisiológica das sementes sejam também considerados. Em adição ao levantamento de microrganismos em sementes é de grande importância identificar as raças patogênicas nos casos em que esses organismos exibem variabilidade dessa natureza.

Para um grande número de patógenos, principalmente do grupo dos vírus e das bactérias, os mecanismos ou os fatores da própria semente que favorecem ou restringem a sua transmissão são ainda pouco investigados. Do ângulo epidemiológico, o conhecimento da taxa de transmissão de patógenos de planta a semente e de semente a progênie é fundamental para a definição de medidas visando ao controle das doenças correspondentes.

É óbvio que o objetivo central da patologia de sementes seja o controle de todas as doenças que podem ocorrer no campo de produção; porém, a preocupação maior é com aquelas cujos agentes podem associar-se às sementes. Conforme já tem sido enfatizado, o aspecto epidemiológico tem sido pouco estudado no contexto da patologia de sementes.

A eficiência de um produto químico no controle de patógenos associados a sementes depende de vários fatores, dos quais a localização do inóculo e a natureza do produto são destaques.

Segundo HOMECHIN et al., (1986); PIZZINATTO & MENTEN (1986) foi observado em seu trabalho nas sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* eram portadores de microrganismos, saprófitas e patogênicos.

De acordo com ANDERSON et al., (1980); BELCHER & MILLER (1980) foi verificada a presença de *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Diplodia* sp. em sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Segundo CHI-CHANG & SHUNG-CHANG JONG (1965) foram observadas as presenças de vários fungos nas sementes de *Pinus*.

De acordo com o trabalho de LASCA; SAMPAIO & CINTRA (1971) foram encontrados fungos de vários gêneros em sementes importadas de *Pinus* spp.

3. OBJETIVO

Isolamento e identificação dos fungos endofíticos em sementes de *Pinus taeda* e de *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para este estudo foram utilizadas 420 amostras de sementes de *Pinus taeda* e 420 amostras de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, fornecidas pela Embrapa Florestas, Colombo/PR, coletadas no ano de 2001 e armazenadas em câmara fria até o momento do estudo.

4.2 MEIO DE CULTURA

4.2.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Nesse trabalho foi utilizado o produto comercial Ágar-Batata-Dextrose Biobrás Diagnósticos para a elaboração de meio sólido em placas de Petri e tubos de ensaio para o isolamento, purificação e cultivo dos isolados. Foram utilizados 39 g do produto para 1000 ml de água destilada.

4.3 SOLUÇÕES

4.3.1 Solução de "Tween 80" 0,1%

"Tween 80".....	0,1 ml
Água destilada.....	99,9 ml

Misturar os componentes e autoclavar por 30 minutos a 1 atm.

4.4 CORANTE E CLAREADOR

4.4.1 Lactofenol azul de algodão (CRUZ,1981)

Ácido lático.....	20,0g
Cristais de fenol.....	20,0g
Glicerina.....	20,0g
Azul de algodão (Methyl blue Difco).....	0,05g
Água destilada.....	20,0ml

Os cristais de fenol foram fundidos em banho-maria, sendo os compostos adicionados em seguida. Esperou-se 24 horas e filtrou-se a solução.

4.4.2 Lactofenol de Amann (CRUZ,1981)

Ácido lático.....	20,0g
Ácido fênico.....	10,0g
Glicerina.....	20,0g
Água destilada.....	10,0ml

4.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

A técnica utilizada para obtenção de fungos endofíticos de sementes, foi a desinfecção de superfície que consiste em imersão 2 vezes em água destilada esterilizada, 1 minuto em etanol 70 %, 5 minutos em hipoclorito de sódio 3 %, 30

segundos em etanol 70 % e finalmente lavados 3 vezes em água destilada esterilizada por 1 minuto. A seguir as sementes foram transferidas para placa de Petri (100 mm) contendo meio de cultura BDA com tetraciclina (100 mg/L de meio) para verificar a eficiência do método. Foram feitas de cada repetição, placas controle contendo 0,1 ml da última água destilada esterilizada utilizada na lavagem, para verificação de possíveis fungos epifíticos contaminantes, (PETRINI, 1986). As placas foram incubadas a 25 °C. Os fungos isolados foram repicados em tubos com meio de cultura BDA e incubados a 25 °C sendo, após o crescimento, mantidos a 4 °C.

4.6 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram inicialmente purificados em solução de “Tween 80” 0,1 %, eliminando qualquer foco de contaminação. Nesta técnica, colocou-se um fragmento do micélio do fungo em um tubo de ensaio contendo 2,0 ml de “Tween 80” 0,1 % esterilizado. Agitou-se por 3 minutos em agitador de tubos e adicionou-se 100ml em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA.

A suspensão foi espalhada na placa com auxílio da alça de Drigalski e utilizou-se a técnica da semeadura em placa para espalhar uniformemente a solução adicionada. As placas foram incubadas a 25 °C em incubadora por aproximadamente 7 dias (dependente da formação de colônias puras dos fungos).

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, por meio da observação de suas estruturas de reprodução (sexual e assexual), utilizando o método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999) e de acordo com literatura especializada (ELLIS, 1971, 1976; BARNETT & HUNTER 1972; ARX, 1974; PETRINI, 1986; KONEMAN & ROBERTS, 1987; ROSSMAN, PALM & SPIELMAN, 1987; ALVES, 1998).

4.7.1 Técnica do microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999)

Para esta técnica utilizaram-se placas de Petri esterilizadas contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Cortou-se um cubo de 1 cm² de meio de cultura BDA e colocou-se sobre a lâmina no interior da placa. Inoculou-se pedaços da colônia do fungo a ser identificado em todos os lados do cubo, cobrindo-o posteriormente com uma lamínula esterilizada. O algodão no interior da placa foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa foi incubada em estufa incubadora durante 7 e 14 dias à 25 °C. Após o tempo determinado a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de lactofenol azul de algodão ou lactofenol azul de Amann, sendo as bordas vedadas com parafina. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*, de um total de 840 sementes 121 sementes foram infectadas no total, 13,57 % em sementes inteiras e 15,24 % em sementes cortadas (TABELA 01).

TABELA 01 – ANÁLISE QUANTITATIVA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS SEMENTES DE *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Hospedeiro	Sementes Inteiras		Sementes Cortadas	
	N	%	N	%
<i>Pinus taeda</i>	14	3,33	30	7,14
<i>Pinus elliottii</i>	43	10,24	34	8,10
Total	57	13,57	64	15,24

Em *Pinus taeda*, das 44 sementes infectadas, 14 foram em sementes inteiras e 30 em sementes cortadas, das 420 sementes inteiras analisadas 3,33 % foram infectadas pelo *Penicillium*, e nas 420 sementes cortadas analisadas 4,52 % foram infectadas pelo *Penicillium*, 0,24 % foram infectadas pelo *Chaetomium*, 0,24 % foram infectadas por fungo dematiáceo, 0,71 % foram infectadas pelo *Mycelia sterilia*, 0,24 % foram infectadas pelo *Acremonium* e 1,19 % por *Paecilomyces*, somando um total de 10,47 % de sementes de *Pinus taeda* infectadas (TABELA 02).

TABELA 02 - ANÁLISE QUALITATIVA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS SEMENTES DE *Pinus taeda*.

Fungos	Sementes Inteiras		Sementes Cortadas	
	N	%	N	%
<i>Penicillium</i> sp.	14	3,33	19	4,52
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-	1	0,24
Fungo dematiáceo	-	-	1	0,24
<i>Mycelia sterilia</i>	-	-	3	0,71
<i>Acremonium</i> sp.	-	-	1	0,24
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	5	1,19
Total	14	3,33	30	7,14

Em *Pinus elliottii* var. *elliottii*, das 77 sementes infectadas, 43 foram em sementes inteiras e 34 em sementes cortadas, das 420 sementes inteiras analisadas 1,43 % foram infectadas pelo *Penicillium* e 8,81 % foram infectadas pelo *Aspergillus*, e nas 420 sementes cortadas analisadas 8,1 % foram infectadas pelo *Aspergillus*, somando um total de 18,34 % de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, infectadas (TABELA 03).

TABELA 03 - ANÁLISE QUALITATIVA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS SEMENTES DE *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Fungos	Sementes Inteiras		Sementes Cortadas	
	N	%	N	%
<i>Penicillium</i> sp.	6	1,43	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.	37	8,81	34	8,10
Total	43	10,24	34	8,10

O número total de infecção em sementes inteiras nas duas espécies foi de 57 e em sementes cortadas foi de 64.

CHI-CHANG e SHUNG-CHANG JONG (1965) detectaram a presença dos fungos *Aspergillus*, *Curvularia*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus* em sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Já no presente trabalho só foram encontrados os fungos *Penicillium* e *Aspergillus*.

ANDERSON, BELCHER e MILLER (1980) verificaram a presença de outros fungos como *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Diplodia* sp. em seu trabalho.

HOMECHIN; PIZZINATTO e MENTEN (1986) observaram que as sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* eram portadores de microrganismos, saprófitas e patogênicos. Os fungos encontrados foram *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp.,

Fusarium moniliforme, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *Helminthosporium* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. que foram constatados em diferentes tratamentos efetuados. Essas sementes foram submetidas ao teste do papel filtro, sendo plaqueadas em placas de Petri de plástico transparente contendo papel de filtro umedecido em água destilada. Parte das sementes foram tratadas durante 3 minutos, em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, antes do plaqueamento, enquanto que, as restantes foram incubadas sem assepsia prévia. A incubação das sementes foi efetuada por um período de 7 dias, a 22°C, sob regime alternado de luz (12 horas luz e 12 horas escuro). Foram testados dois tipos de luz: luz negra (próximo a ultravioleta) e luz do dia de 40 watts.

LASCA, SAMPAIO e CINTRA (1971), encontraram os fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Chaetomium* em semente importadas de *Pinus* spp. Para os isolamentos usou-se placas de Petri com meio de agar-água e agar-batata-dextrose, onde eram colocadas as sementes a serem testadas.

Uma hipótese razoável para explicar que em *Pinus elliottii* var. *elliottii*, houberam mais sementes contaminadas que *Pinus taeda* seria a diferença no tempo de floração e de frutificação entre as espécies florestais.

Todos os autores comentam que apesar dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* serem encontrados em sementes de *Pinus*, não são considerados patogênicos às pináceas, portanto podem ser endofíticos não causando benefício ou prejuízo e quando as sementes foram plantadas nas árvores não foram verificadas doenças.

Os mesmos gêneros que foram verificados na monografia e nos trabalhos da literatura, indicam assim que são fungos comumente presentes em sementes de pinus.

Talvez a baixa frequência e diversidade de fungos nas sementes, principalmente de *Pinus elliottii* var. *elliottii* no presente trabalho, possa ser devida ao processo de desinfecção.

6. CONCLUSÃO

Em *Pinus taeda* o fungo mais freqüente foi o *Penicillium* sp. sendo que foram encontrados em sementes cortadas 4,52 %, e em sementes inteiras 3,33 %.

Em *Pinus elliottii* var. *elliottii*, o fungo mais freqüente foi *Aspergillus* sp., sendo que foram encontradas em sementes inteiras 8,81 %, e em sementes cortadas 8,10%.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. L.; BELCHER, E.; MILLER, T.; Occurrence of seed fungi inside slash pine seeds produced in seed orchard in the United States. 1984. p.795-799.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O., ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, n. 1, p. 40-64, fev. 2000.

CARROL, G. C. Forest endophytes; pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1313-1324, 1995.

CHABOUSSOU, F. **Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose**. Porto Alegre: L & PM, 1987.

CHI-CHANG, C. JONG, S.; Factor affecting the isolation of microorganisms associated with coniferous seeds. 1965. p.106-115.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. Itaguaí: UFRJ-Imprensa Universitária, 1981.

FUNK, C. R.; HALINSK, P. M.; JOHNSON, M. C.; SIEGEL, M. R.; STEWART, A. V.; AHMAD, S.; HURLEY, R. H.; HARVEY, I. C. An endofhytic fungus and resistance to sod webworms: association in *Lolium perene*. **Biotechnology**, v. 1, p. 189-191, 1983.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, o.895, 914, 1997.

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*. 1986. p.103-111.

LASCA, C. C.; SAMPAIO, A. S.; CINTRA, A. F.; Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. 1971. 287-292.

LIU, C. I.; ZOU, W.X.; LU, I.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endofhyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 277-282, 2001.

MACHADO, José da Cruz. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: 1988. p.19-21 p.89-94. Lavras: ESAL/FAEPE.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. V. D. **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge University Press, 1986.

PIMENTEL I. C. **Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas.** Curitiba, 2001. 154p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná.

STROBEL, G. A.; DIRKSIE, F.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p.2943-2950, 2001.

PESQUISA-INTERNET

Jeito Tok&Stok - Edição 2: Especial: *Pinus elliotti*

www.tokstok.com.br

Acessado em: 26/11/2005

Quantum - Boletim educativo do Núcleo de Comunicação do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - agosto de 2003 - ano 2 - n. 2

RUFINO, A. M. M. **Botucatu pesquisa novos usos para o *Pinus taeda*.**

Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp (FCA), campus de Botucatu.

Disponível em:

http://proex.reitoria.unesp.br/informativo/WebHelp/2003/edi__o34/pinustaeda.htm

Acessado em: 26/11/2005.