



Health and transmission of fungi associated with seeds of *Luehea divaricata*

Sanidade e transmissão de fungos associados a sementes de *Luehea divaricata*

Alexsandra Cezimbra Quevedo¹, Marlove Fátima Brião Muniz², Clair Walker³, Mateus Alves Saldanha¹

Abstract: Research related to the pathology of seeds of native forest species, açoita-cavalo (*Luehea divaricata*), is scarce. This study aimed to evaluate the sanitary and physiological quality of whipshorse seeds and the possible transmission of fungi associated with the seeds to the seedlings, in lots from Santa Maria - RS. Were 100 seeds used, divided into four repetitions of 25 per lot (2016 and 2018) and test. The health test was carried out in which the seeds without asepsis were placed in "gerbox" boxes with filter paper substrate at a temperature of 25 °C, with a photoperiod of 12 h for seven days. The germination test and the fungi transmission test seeds were conducted in a germination room at a temperature of 25 °C, and a photoperiod of 12 h. Only the seeds used in the germination test underwent asepsis. The evaluations of the two tests consisted of the First Germination Count (at 14 days) and the count in the number of normal, abnormal seedlings, and non-germinated seeds (at 28 days). In the health test, fungi were identified and quantified: *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotia* sp. and *Epicoccum* sp. The *Fusarium* genus was identified associated with the symptoms of browning and rotting in seedling roots in the transmission test. The sample from 2018 showed greater vigor, reaching 21% at 14 days, not different from the lot of 2016 that reached 10%. The lot of 2018 presented the best results concerning health, vigor, and germination.

Key words: Açoita-cavalo. *Fusarium*. Seed vigor. Seed pathology.

Resumo: Pesquisas relacionadas à patologia de sementes de espécies florestais nativas, como açoita-cavalo (*Luehea divaricata*), são escassas. Assim, objetivou-se com o presente estudo avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de açoita-cavalo e a possível transmissão de fungos associados às sementes para as plântulas, em lotes de Santa Maria - RS. Foram utilizadas 100 sementes, divididas em quatro repetições de 25 por lote (2016 e 2018) e teste. Foi realizado o teste de sanidade onde as sementes sem assepsia foram colocadas em caixas "gerbox" com substrato de papel-filtro por sete dias. O teste de germinação e o teste de transmissão de fungos via sementes foram realizados em sala de germinação. As condições dos três testes eram temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Apenas as sementes utilizadas no teste de germinação passaram por assepsia. Avaliou-se, desses dois testes, as seguintes variáveis: primeira contagem de germinação aos 14 dias e contagem no número de plântulas normais, anormais, e de sementes não germinadas aos 28 dias. No teste de sanidade foram identificados e quantificados os fungos: *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotia* sp. e *Epicoccum* sp. O gênero *Fusarium* foi transmitido via semente, causando necrose no sistema radicular e tombamento de plântulas de açoita-cavalo. A amostra procedente do lote de 2018 obteve os resultados de vigor, atingindo aos 14 dias 21% de germinação, no entanto não diferindo do lote de 2016 que atingiu 10%. Assim, o lote 2018 apresentou melhores resultados em relação a sanidade e germinação das sementes.

Palavras-chave: Açoita-cavalo. *Fusarium*. Vigor de sementes. Patologia de sementes.

*Corresponding author

Submitted for publication on 09/03/2020, approved on 26/05/2020 and published on 27/06/2020

¹Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Defesa Fitossanitária, CEP 97105-900, Santa Maria, RS. E-mails: alequevedo1997@gmail.com; mtsmateusalves@gmail.com

²Professora titular, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Defesa Fitossanitária. E-mail: marlovemuniz@yahoo.com.br

³Professora temporária, Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Agronomia. E-mail: clairwalker@gmail.com

INTRODUCTION

Luehea divaricata Mart., popularly known as “açoita-cavalo” (whips-horse), is a tree species, belonging to the Malvaceae family, which presents good quality wood, used for bent furniture making and construction industry. Due to the rapid growth, the species is recommended for mixed reforestation of areas allocated for environmental preservation; besides, they have ornamental characteristics valued for landscaping (LORENZI, 2014). It is a melliferous species, presenting medicinal properties and potential for cellulose production (SARMENTO; VILELA, 2010).

There are some literatures with the species that have indicated pathogens associated with seeds; however, researches that conclude whether fungi associated with seeds can be transmitted to seedlings are still scarce (BERNARDI-WENZEL *et al.*, 2010; MACIEL *et al.*, 2013; CARMO *et al.*, 2017). Thus, it is observed that the low quality of some native forest species seedling may be related to the health conditions of the seeds, which demanded the detection and control of pathogens (BENETTI *et al.*, 2009).

Knowing seed quality is primary and, in this sense, because it is a biological input affected by several factors, its handling requires special care (FANTINEL *et al.*, 2013).

The physiological quality of seeds can be evaluated by germination and vigor tests, which are conducted to separate the seed lots with different quality and to forecast the maximum germination and vigor potential of the seeds (WALKER *et al.*, 2015). Health quality is of major significance, as it deals with the association of pathogenic microorganisms to seeds, influencing viability, longevity, and, consequently, the quality of the seedlings (CHEROBINI *et al.*, 2008). During the physiological maturation of seeds, the vigor behaves similarly to germination, reaching the maximum of vigorous seeds at a time that is very close to the accumulation of reserves (MARCOS FILHO, 2015).

The presence of pathogens in seeds, both internally and externally, can reduce the ability of germination. In this sense, specific attention shall be given to the pathogens associated with seeds of native species, since some may cause damage to the production of seedlings with quality (PARISI *et al.*, 2019).

INTRODUÇÃO

A espécie *Luehea divaricata* Mart., conhecida popularmente como açoita-cavalo, é uma árvore pertencente à família Malvaceae, que apresenta madeira de boa qualidade, utilizada na confecção de móveis vergados e construção civil. Em razão do rápido crescimento, a espécie é recomendada para reflorestamentos mistos de áreas destinadas à preservação, além de possuir características ornamentais recomendadas para o paisagismo (LORENZI, 2014). É uma espécie melífera com propriedades medicinais, e com potencial para produção de celulose (SARMENTO; VILELA, 2010).

Alguns trabalhos já realizados com a espécie indicaram patógenos associados às sementes, porém ainda são escassas as pesquisas que concluem se os fungos associados às sementes podem ser transmitidos às plântulas (BERNARDI-WENZEL *et al.*, 2010; MACIEL *et al.*, 2013; CARMO *et al.*, 2017). Assim, observa-se que a baixa qualidade de algumas mudas de espécies florestais nativas pode ter relação com as condições sanitárias das sementes, necessitando de detecção e controle de patógenos nas mesmas (BENETTI *et al.*, 2009).

Inicialmente, é fundamental conhecer a qualidade das sementes e, neste sentido, por se tratar de um insumo biológico afetado por uma série de fatores, sua manipulação requer cuidados especiais (FANTINEL *et al.*, 2013).

A qualidade fisiológica das sementes pode ser avaliada por testes de germinação e vigor, os quais são realizados para separar os lotes de sementes com diferente qualidade e fazer a previsão do potencial de máxima germinação e vigor das sementes (WALKER *et al.*, 2015). A qualidade sanitária assume fundamental importância, pois trata da associação de microrganismos patogênicos às sementes, influenciando na viabilidade, longevidade e, conseqüentemente, na qualidade da muda (CHEROBINI *et al.*, 2008). Durante a maturação fisiológica das sementes, o vigor se comporta de maneira semelhante à germinação, atingindo o máximo de sementes vigorosas em época muito próxima com o acúmulo de reservas (MARCOS FILHO, 2015).

A presença de patógenos em sementes, tanto interna quanto externamente, pode reduzir o poder germinativo. Nesse sentido, maior atenção deve ser dada aos patógenos associados às sementes de espécies nativas, visto que alguns podem causar danos à produção de mudas com qualidade (PARISI *et al.*, 2019).

The health quality of seeds of forest species is a prominent factor in germination since it may cause losses through deterioration, abnormalities, and injuries in seedlings, in which the fungi is the most important causal agents, remaining viable for long periods (LAZAROTTO *et al.*, 2010).

The knowledge of the proper conditions to carries out the germination test for each species is needed due to the singular responses concerning various factors such as substrates, temperature, amount of water, oxygen, light, and the occurrence of pathogens associated with the seeds (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

In general, it is observed that studies on the incidence of fungi in forest species are increasing; on the other hand, there are still few studies in the literature reporting the use of whips-horse specie (SILVA, 2004; BERNARDI-WENZEL *et al.*, 2010; MACIEL *et al.*, 2013). It is also noticed that studies related to pathology and seed quality of forest species are still limited in all aspects (FANTINEL *et al.*, 2015).

According to the Instructions for Analysis of Seeds of Forest Species (BRASIL, 2013), the seeds germination in a laboratory test is represented by the emergence and development of essential structures of an embryo, demonstrating its ability to produce a normal plant under favorable environmental conditions. Thus, the present study aimed to evaluate the health and physiological qualities of whips-horse seeds and the possible transmission of fungi associated with seeds to the seedlings, in lots from Santa Maria - RS.

MATERIAL AND METHODS

The whips-horse seeds used in the present study came from the Forest Research Center (DDPA/SEAPI/RS), located in the district of Boca do Monte, municipality of Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil. The seeds were stored in chambers that are dry and cold, with temperatures ranging from 6 to 9° C, and relative humidity between 45 and 65%.

Origins and harvest periods are identified in Table 1. The germination, health, and transmission tests were conducted at the Laboratory of Forest Phytopathology “Eloicy Minussi” at the Federal University of Santa Maria.

A qualidade sanitária de sementes de espécies florestais é um importante fator na germinação, pois pode ocasionar perdas por meio da deterioração, anormalidades e lesões nas plântulas, sendo os fungos os agentes causais mais importantes, permanecendo viáveis por longos períodos de tempo (LAZAROTTO *et al.*, 2010).

O conhecimento das condições adequadas para a realização do teste de germinação para cada espécie é necessário, basicamente pelas respostas singulares em relação aos diversos fatores como substratos, temperatura, quantidade de água, oxigênio, luz e ocorrência de agentes patogênicos associados às sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Em geral, observa-se que estudos sobre a incidência de fungos em espécies florestais estão aumentando, porém em açoita-cavalo ainda são poucos os trabalhos (SILVA, 2004; BERNARDI-WENZEL *et al.*, 2010; MACIEL *et al.*, 2013). Percebe-se que estudos referentes à patologia e à qualidade de sementes de espécies florestais ainda são limitados em todos os aspectos (FANTINEL *et al.*, 2015).

De acordo com as Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (BRASIL, 2013), a germinação de sementes em teste de laboratório é representada pela emergência e desenvolvimento de estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições ambientais favoráveis. Assim, objetivou-se com o presente estudo avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de açoita-cavalo e a possível transmissão de fungos associados às sementes para as plântulas, em lotes procedentes de Santa Maria - RS.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de açoita-cavalo utilizadas no presente estudo foram provenientes do Centro de Pesquisa em Florestas (DDPA/SEAPI/RS), localizado no distrito de Boca do Monte, município de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brasil. As sementes foram armazenadas em câmara fria-seca com temperatura variando entre 6 e 9 °C, com umidade relativa do ar entre 45 e 65%, .

As procedências e épocas de coleta estão identificadas na Tabela 1. Os testes de germinação, sanidade e transmissão foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia Florestal “Eloicy Minussi” da Universidade Federal de Santa Maria.

Table 1 - Origins and harvest periods of samples of whips-hors seeds (*Luehea divaricata*)

Tabela 1 - Procedência e período de coleta de amostras de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata*)

Sample	Coordinates (GMS)	Harvest date
Lot 2016	29°73'53,8" S 53°55'55,9" W	12/05/2016
Lot 2018	29°73'53,8" S 53°55'55,9" W	09/05/2018

Health Test

From each lot, 100 seeds were used, without asepsis, divided into four replications of 25 each. The seeds were arranged in transparent plastic boxes (gerbox) and covered with filter paper moistened with sterile distilled water. The material was stored in a germination room at a temperature of 25 ± 2 °C and a photoperiod (12 h of white light and 12 h in the dark), for seven days.

After this period, the evaluation and identification of the fungal genera associated with seeds were carried out with the aid of a stereoscopic and optical microscope, in addition to specialized bibliography (BARNETT; HUNTER, 1999).

The results were expressed as a percentage of incidence for each fungal genus. In the case of the identification of any fungus considered potentially pathogenic in the health test, it was isolated in a Potato-Dextrose-Agar (PDA) medium.

Germination test

In the experiment, 100 seeds were used, divided into four replications of 25 for each lot. The seeds asepsis was made by immersion in five drops of neutral detergent in 100 mL of water for 8 minutes. Then, they were washed in sterile distilled water until a complete detergent removal (BRASIL, 2013).

The autoclaved sand at 121 °C for 60 min was used as a substrate, put in the gerboxes, up to half, and moistened with sterile distilled water. The sowing was carried out into the sand, 25 seeds per box, and, after that, they were covered with another thin layer of sand, and again, wet with sterile distilled water (BRASIL, 2009). The material remained in the germination room (25 ± 2 °C) in a 12 h photoperiod, with daylight fluorescent lamps, and irrigating manually whenever necessary.

Teste de Sanidade

Foram utilizadas 100 sementes de cada lote, sem assepsia, divididas em quatro repetições de 25 cada. As sementes foram dispostas em caixas de plástico transparente (gerbox) e forradas com papel-filtro umedecido com água destilada esterilizada. O material foi acondicionado em sala de germinação com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo (12 h de luz branca e 12 h de escuro), durante sete dias.

Após esse período, foi realizada a avaliação e identificação dos gêneros fúngicos associados às sementes, com auxílio de microscópio (estereoscópico e óptico) e bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999).

Os resultados foram expressos em porcentagem de incidência para cada gênero fúngico. No caso de identificação de algum fungo considerado potencialmente patogênico no teste de sanidade, este foi isolado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Teste de germinação

Foram utilizadas 100 sementes, divididas em quatro repetições de 25 para cada lote. A asepsia das sementes foi realizada com a imersão destas em cinco gotas de detergente neutro em 100 mL de água por 8 minutos, em seguida, lavadas em água destilada esterilizada até completa remoção do detergente (BRASIL, 2013).

Utilizou-se como substrato a areia autoclavada a 121 °C durante 60 min. O substrato foi acondicionado em caixas gerbox onde foi colocado areia até a metade das caixas e umedecida com água destilada esterilizada. A semeadura foi realizada entre areia, sendo 25 sementes por caixa e, logo após, foram cobertas com mais uma leve camada de areia e, posteriormente novamente molhadas com água destilada esterilizada (BRASIL, 2009). O material permaneceu na sala de germinação (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 12 h com lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com irrigação manual sempre que necessário.

The evaluation of the first germination count (FGC) and of normal seedlings was considered as the vigor assessment carried out at 14 days after the installation of the test. Also, at 28 days, the number of normal, abnormal seedlings and non-germinated seeds (NGS) was counted (BRASIL, 2013).

Test of fungi transmission by seeds

Additionally, 100 non-disinfected seeds were used, divided into four replications of 25 for each lot. Autoclaved sand at 121 °C for 60 min was used as a substrate. The substrate has been placed in gerboxes, where sowing was carried out into the sand, 25 seeds per box, as mentioned in the germination test. Likewise, the material remained in the germination room (25 ± 2 °C) in a 12 h photoperiod, with daylight fluorescent lamps, and irrigating manually whenever necessary.

The first germination count was at 14 days, and the final count at 28 days, as mentioned in the germination test. Symptomatic seedlings and non-germinated seeds were placed in a humid chamber, where they remained for seven days to identify the associated pathogens.

Statistical analysis

The experimental design used was completely randomized, with four replications for each test. In the analysis of variance, data that did not follow a normal distribution were transformed using the arcsine $(x/100)^{0.5}$ function. Statistical analyzes were performed using the software SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

The incidence of storage and potentially pathogenic fungi in whips-horse seeds by the paper-filter method are shown in Table 2. From the analyzed data, the presence of *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp. and *Epicoccum* sp., were verified. These fungi occurred in both lots, except *Rhizopus* sp. that was found only in the lot of 2016.

A avaliação de primeira contagem de germinação (PCG) e de plântulas normais foi considerada como a avaliação de vigor, realizada aos 14 dias após a instalação do teste. Aos 28 dias, contabilizou-se o número de plântulas normais, anormais e de sementes não germinadas (SNG) (BRASIL, 2013).

Teste de transmissão de fungos via sementes

Foram utilizadas 100 sementes não desinfestadas, divididas em quatro repetições de 25 para cada lote. Utilizou-se como substrato areia autoclavada a 121 °C durante 60 min. O substrato foi acondicionado em caixas gerbox, onde foi realizada a semeadura entre areia, 25 sementes por caixa, conforme foi citado no teste de germinação. O material permaneceu na sala de germinação (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 12 h com lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com irrigação manual sempre que necessário.

A primeira contagem de germinação foi aos 14 dias, e a contagem final aos 28 dias, conforme foi citado no teste de germinação. As plântulas sintomáticas e as sementes não germinadas foram colocadas em câmara úmida, onde permaneceram por sete dias para a identificação dos patógenos associados.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada teste. Na análise de variância, os dados que não seguiram distribuição normal, foram transformados utilizando a função arcoseno $(x/100)^{0.5}$. As análises estatísticas foram realizadas no *software* SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência de fungos de armazenamento e potencialmente patogênicos nas sementes de açoita-cavalo pelo método papel-filtro pode ser observada na Tabela 2. A partir dos dados analisados, verificou-se a presença de *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp. e *Epicoccum* sp. Estes fungos ocorreram nos dois lotes, exceto *Rhizopus* sp., que foi encontrado apenas no lote 2016.

Table 2 - Incidence (%) of fungi associated with horse-whip (*Luehea divaricata*) seeds, detected by the filter paper method, from lots in Santa Maria - RS**Tabela 2** - Incidência (%) de fungos associados a sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata*), detectados pelo método de papel-filtro, procedentes de lotes de Santa Maria - RS

Origin	Fungi (%)							
	<i>Rhizopus</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Pestalotia</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Epicoccum</i>
Lot 2016	94 a*	6 b	50 a	51 b	8 a	6 a	30 a	2 b
Lot 2018	0 b	65 a	12 b	95 a	4 a	6 a	14 b	21 a
Mean	47.0	35.5	31.0	73.0	6.0	6.0	22.0	11.5
CV (%)	2.82	23.2	27.96	17.64	51.4	23.87	18.01	28.45

*Means followed by different letters in the column differ statistically from each other by the F test at 5% probability of error. CV (%) = coefficient of variation.

*Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. CV (%) = coeficiente de variação.

The results expressed as fungal genera showed that *Rhizopus* sp. (94%) and *Cladosporium* sp. (95%), were that presented the highest incidence percentages in the lots of 2016 and 2018, respectively. Moreover, *Rhizopus* sp. is considered a storage fungus and may cause seeds to rot, and *Cladosporium* sp. is a pathogenic fungus, and might be transmitted from seeds to seedlings. Carmo *et al.* (2017), when detecting fungi in seeds of six native forest species of the Atlantic Forest, observed that *Cladosporium* sp. was the most commonly found in the study, reaching 72.5% in whips-horse seeds. Bernardi-Wenzel *et al.* (2010) reported the occurrence of the genera *Alternaria* and *Epicoccum* associated with leaves of *Luehea divaricata* collected in Maringá, Paraná (PR), Brazil.

The genera *Penicillium* and *Aspergillus* can reduce the germinative power of the seed and induce embryo death; besides, these fungi have an increased incidence in inadequate storage conditions (CHEROBINI *et al.*, 2008). In this study, these two genera were found in the two evaluated lots and, therefore, it is possible to infer that they decrease the quality of the seeds.

Some research has contributed to the identification of fungi present in seeds of forest species, for instance, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A., *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj, *Fusarium* sp., *Epicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Pestalotia* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp. and *Aspergillus* sp. (PADULLA *et al.*, 2010; LAZAROTTO *et al.*, 2010). The mean values of the physiological potential of the whips-horse seeds are given in Table 3.

Os gêneros fúngicos que apresentaram as maiores porcentagens de incidência, para os lotes 2016 e 2018, foram: *Rhizopus* sp. (94%) e *Cladosporium* sp. (95%), respectivamente. *Rhizopus* sp. é considerado um fungo de armazenamento e pode ocasionar o apodrecimento de sementes, e *Cladosporium* sp. é um fungo patogênico e pode ser transmitido das sementes para as plântulas. Carmo *et al.* (2017), ao detectar fungos em sementes de seis espécies florestais nativas da Mata Atlântica, observaram que *Cladosporium* sp. foi o mais comumente encontrado no trabalho, chegando a 72,5% nas sementes de açoita-cavalo. Bernardi-Wenzel *et al.* (2010) relataram a ocorrência dos gêneros *Alternaria* e *Epicoccum* associados a folhas de *Luehea divaricata* coletadas em Maringá, Paraná (PR), Brasil.

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* têm a capacidade de reduzir o poder germinativo da semente e causar a morte do embrião, além disso, esses fungos têm sua incidência aumentada em condições de armazenamento inadequado (CHEROBINI *et al.*, 2008). Nesse estudo, esses dois gêneros foram encontrados nos dois lotes avaliados e, dessa maneira, é possível inferir que eles diminuem a qualidade das sementes.

Algumas pesquisas têm contribuído para a identificação de fungos presentes em sementes de espécies florestais, nos quais os autores relataram a incidência de fungos, como *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A., *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj, *Fusarium* sp., *Epicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Pestalotia* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp. e *Aspergillus* sp. (PADULLA *et al.*, 2010; LAZAROTTO *et al.*, 2010). Os valores médios do potencial fisiológico das sementes de açoita-cavalo são apresentados na Tabela 3.

Table 3 - Mean values (%) of first germination count (FGC), normal seedlings, abnormal seedlings and non-germinated seeds (NGS) in the germination test of whips-horse (*Luehea divaricata*) seeds

Tabela 3 - Valores médios (%) de primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas (SNG) no teste de germinação de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata*)

Origin	FGC	Normal	Abnormal	NGS
Lot 2016	10 a*	21 b	2 a	77 a
Lot 2018	21 a	51 a	7 a	42 b
Mean	15.5	36.0	4.5	59.5
CV (%)	30.78	20.78	53.46	8.96

* Means followed by different letters in the column differ statistically from each other by the F test at 5% probability of error. CV (%) = coefficient of variation.

*Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. CV (%) = coeficiente de variação.

Lots of 2018 and 2016 showed an emergence percentage in the first germination count, statistically similar to the 14 days of 15.5%. According to Nakagawa (1999), the first count test is based on the principle that samples with higher percentages of normal seedlings in the first count are more vigorous. The lots were similar in terms of vigor.

In the final germination count, made on 28 days, the lots of 2018 and 2016 differed statistically from each other, with 51 and 21% emergence from normal seedlings, respectively (Table 3); indicating, therefore, that the lot of 2018 may be higher than the lot of 2016. In a research conducted by Silva (2004), the emergence percentage of seeds of the same species, coming from the metropolitan region of Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil, reached 75%, with sand as a substrate.

These variations in the emergence values from one region to another, or even within the same zone, would associate with factors such as soil, humidity, and light conditions that the mother tree is located (MACIEL *et al.*, 2013). In a study carried out by Felippi *et al.* (2012), they conclude that the germinative index of “louro-pardo” (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud.) seeds oscillates, probably due to the variation of each mother tree and its micro-habitat.

Os lotes 2018 e 2016 apresentaram percentual de emergência na primeira contagem de germinação estatisticamente semelhantes aos 14 dias de 15,5%. Segundo Nakagawa (1999), o teste de primeira contagem baseia-se no princípio de que amostras com maiores percentagens de plântulas normais na primeira contagem são mais vigorosas. Os lotes se mostraram semelhantes quanto ao vigor.

Já na contagem final de germinação, aos 28 dias, os lotes de 2018 e 2016 diferiram estatisticamente entre si, apresentando 51 e 21% de emergência das plântulas normais, respectivamente (Tabela 3). Isso pode ser um indicador que o lote 2018 seja superior ao 2016. Em pesquisa realizada por Silva (2004), o percentual de emergência de sementes dessa mesma espécie, oriundas da região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil, atingiu 75%, tendo como substrato areia.

Essas variações nos valores de emergência de uma região para outra, ou até mesmo dentro de uma mesma região, podem estar associadas a fatores como condições de solo, umidade e luz que a árvore matriz está localizada (MACIEL *et al.*, 2013). Felippi *et al.* (2012) afirmam que o índice germinativo de sementes de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud.) é oscilante, provavelmente em função da variação de cada árvore matriz e seu micro-habitat.

The lots of 2016 and 2018 did not differ statistically regarding the percentage of abnormal seedlings, 2 and 7%, respectively. According to Popinigis (1985), deteriorated seeds can originate seedlings, even if not vigorous, but that contribute to the final germination result.

In the transmission test, the presence of abnormal symptomatic seedlings was 1 and 21% for lots of 2016 and 2018, respectively. However, in the lot of 2016, the percentage of non-germinated seeds (NGS) reached 92%, differing statistically with the lot of 2018, presenting 56% of SNG (Table 4).

Both lots presented structures of the fungus *Fusarium* sp. in NGS, as well as in the primary structures of abnormal seedlings. Furthermore, the pathogen was verified in the root system, causing necrotic spots on the surface of the roots, leading them to darken and rotting. The fungus caused some symptoms such as growth stagnation and ascendant yellowing of the leaves, as shown in Figure 1.

Os lotes 2016 e 2018 não diferiram estatisticamente em relação ao percentual de plântulas anormais sendo 2 e 7%, respectivamente. Segundo Popinigis (1985), sementes deterioradas podem originar plântulas, mesmo não vigorosas, mas que contribuem para o resultado final da germinação.

No teste de transmissão, a presença de plântulas anormais sintomáticas foi de 1 e 21% para os lotes de 2016 e 2018, respectivamente. No lote 2016, o percentual de sementes não germinadas (SNG) alcançou 92%, diferindo estatisticamente do lote de 2018, que atingiu 56% de SNG (Tabela 4).

Os dois lotes apresentaram estruturas do fungo *Fusarium* sp. nas NGS, bem como, nas estruturas primárias das plântulas anormais. O patógeno foi verificado no sistema radicular provocando, primeiramente, manchas necróticas na superfície das raízes, como consequência as raízes escureceram e apodreceram. É possível verificar que o fungo ocasionou alguns sintomas como a estagnação do crescimento e o amarelecimento ascendente das folhas (Figura 1).

Table 4 - Mean values (%) of first germination count (FGC), normal seedlings, abnormal seedlings, symptomatic abnormal seedlings (SA), and non-germinated seeds (NGS) in the germination test of whips-horse (*Luehea divaricata*) seeds

Tabela 4 - Valores médios (%) de primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais, plântulas anormais, plântulas anormais sintomáticas (AS) e sementes não germinadas (SNG) no teste de transmissão de fungos via sementes de açoitacaval (*Luehea divaricata*)

Origin	FGC	Normal	Abnormal	SA	NGS
Lot 2016	0 b*	4 a	3 a	1 a	92 a
Lot 2018	5 a	22 a	1 a	21 a	56 b
Mean	2.5	13.0	2.0	11.0	74.0
CV (%)	51.28	101.32	68.95	86.76	10.99

* Means followed by different letters in the column differ statistically from each other by the F test at 5% probability of error. CV (%) = coefficient of variation.

*Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. CV (%) = coeficiente de variação.

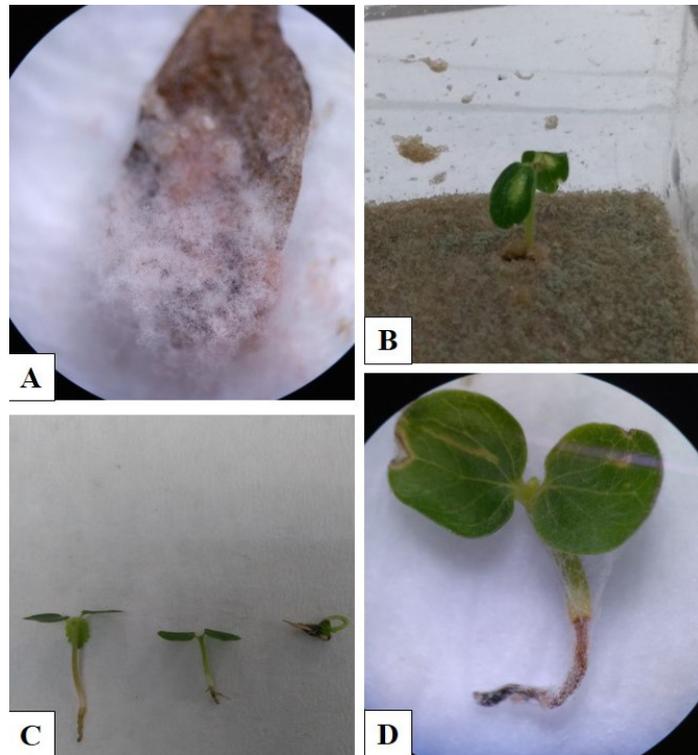


Figure 1 - *Fusarium* sp. associated with seeds and roots of *Luehea divaricata* seedlings in a fungi transmission test by seeds. (A) Seed with fungal infection signs; (B) symptomatic seedling in the seed transmission test; (C) defective seedlings infected by the fungus; (D) seedling examined through a stereomicroscope with symptoms of darkening and root rot.

Figura 1 - *Fusarium* sp. associado a sementes e raízes de plântulas de *Luehea divaricata* em teste de transmissão de fungos via sementes. (A) Semente com sinais de infecção pelo fungo; (B) plântula sintomática no teste de transmissão via semente; (C) plântulas defeituosas infectadas pelo fungo; (D) plântula vista pelo microscópio estereoscópico com sintomas de escurecimento e apodrecimento de raízes.

Maciel *et al.* (2012) identified several fungal genera associated with “angico-vermelho” (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan.) seeds, in which *Fusarium* spp. was pathogenic to the seedlings and exhibited symptoms similar to those observed in the present study, such as rotting of the cotyledons and malformation of the root system.

Maciel *et al.* (2012) identificaram vários gêneros fúngicos associados a sementes de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan.), sendo que *Fusarium* spp. foi patogênico às plântulas e demonstrou sintomas parecidos com os observados na presente pesquisa, como o apodrecimento dos cotilédones e má formação do sistema radicular.

Apart from this, it was possible to verify that *Fusarium* sp. was transmitted from seed to seedlings. According to Mafia (2007), in cases which the attack of the pathogen results in the death of the embryo before the seedling emerges in the substrate, it is termed pre-emergence tipping. The emergence percentage at 14 day (FGC) in the lot of 2018 reached 5%, differing from lots of 2016 that did not emerge any seedling. Other studies confirm the transmission of *Fusarium* sp. seedling for seedlings. Lazarotto *et al.* (2010) identified *Fusarium* sp. in the transmission test with cedar seeds, causing root, neck, and cotyledon rot.

Seeds are propagative units of plants widely used by human beings, making the identification of phytopathogens associated with seeds in a relevant process. Therefore, the health and viability of seeds of forest species are very important to obtain seedlings of good health and physiological quality (SALDANHA *et al.*, 2020).

CONCLUSIONS

The genera of fungi identified associated with *Luehea divaricata* seeds were: *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Pestalotia* and *Epicoccum*.

Fusarium sp. was transmitted by seed, inducing necrosis in the root system and tipping of *Luehea divaricata* seedlings.

The lot of 2018 presented the best results in relation to seed health and germination.

Verificou-se que *Fusarium* sp. foi transmitido da semente para as plântulas. Conforme Mafia (2007), os casos em que o ataque do patógeno resulta na morte do embrião, antes de ocorrer a emergência da plântula no substrato, denominam-se tombamento de pré-emergência. O percentual de emergência aos 14 dias (PCG) para o lote de 2018 atingiu 5%, diferindo do lote de 2016, que não emergiu nenhuma plântula. Outros trabalhos confirmam a transmissão de *Fusarium* sp. de sementes para plântulas. Lazarotto *et al.* (2010) identificaram *Fusarium* sp. no teste de transmissão com sementes de cedro, causando apodrecimento das raízes, colo e cotilédones.

As sementes são as unidades propagativas das plantas mais utilizadas pelo homem, o que torna a identificação dos fitopatógenos associados às sementes um processo muito importante. O cuidado com a sanidade e viabilidade das sementes de espécies florestais é fundamental a fim de se obter mudas de boa qualidade sanitária e fisiológica (SALDANHA *et al.*, 2020).

CONCLUSÕES

Os gêneros fúngicos identificados associados às sementes de *Luehea divaricata* foram: *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Pestalotia* e *Epicoccum*;

Fusarium sp. foi transmitido via semente, causando necrose no sistema radicular e tombamento de plântulas de *Luehea divaricata*;

O lote 2018 apresentou os melhores resultados em relação à sanidade e à germinação das sementes.

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrate genera of imperfect fungi**. 3rd ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999.
- BENETTI, S. C.; SANTOS, A. F.; JACCOUD FILHO, D. de S. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 79-83, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4336/2009.pfb.58.81>
- BERNARDI-WENZEL, J.; GARCÍA, A.; CELSO FILHO, J. R.; PRIOLI A. J.; PAMPHILE, J. A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biological Research**, v. 43, p. 375-384, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602010000400001>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. **Instruções para análise de espécies florestais. Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília: MAPA/ACS, 2013. 98 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília: MAPA/ACS 2009. 398 p.
- CARMO, A. L. M.; MAZARATTO, E. J.; ECKSTEIN, B.; SANTOS, A. F. Associação de Fungos com Sementes de Espécies Florestais Nativas. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 246-247, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2211>
- CARVALHO, N. M; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**, 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.
- CHEROBINI, E. A. I.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade da semente e mudas de cedro. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/19805098511>
- FANTINEL, V. S.; OLIVEIRA, L. M.; MUNIZ, M. F. B.; ROCHA, E. C. Detecção de fungos e transmissão de *Alternaria alternata* via sementes de ipê-amarelo, *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex de) Mattos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 7, n. 2, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.18316/1095>
- FANTINEL, V. S.; OLIVEIRA, L. M.; CASA, R. T.; ROCHA, E. C.; SCHNEIDER, P. F.; VICENTE, D.; Tratamentos de sementes de goiaba-serrana (*Acca sellowiana*): efeito na incidência de fungos e na germinação. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, p. 84-89, 2015.
- FELIPPI M.; MAFFRA C. R. B.; CANTARELLI E. B., ARAÚJO, M. M., LONGH, S. J. Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 631-641, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/198050986629>
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- LAZAROTTO, M; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa phytopathol**, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000200005>
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, São Paulo, v. 01, ed. 6, p. 251, 2014.
- MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F.; LAZAROTTO, M. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho). **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 323-328, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052012000400009>
- MACIEL, C. G.; SOUZA, L. B.; BOVOLINI, M. P.; BRUM, D. L.; MUNIZ, M. F. B.; BURIOL, G. A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata*). **Pesquisa florestal brasileira**, v. 33, n. 75, p. 331-338, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.75.457>
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; JÚNIOR, M. F. R. de R. Tombamento de mudas de espécies florestais causado por *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Revista Árvore**, v. 31, n. 4. p. 629-634, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622007000400007>

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina, PR: Esalq, 2015. 659 p.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETTO, J. B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2. p.1-21.

PADULLA, T. L.; MORAES, M. H. D.; BARBEDO, C. J.; BORGES, I. F.; MENTEN, J. O. M.; PASCHOLATI, S. F. Detecção de fungos em sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) coletadas durante sua formação e dispersão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 154-159, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000200019>

PARISI, J. J. D.; SANTOS, A. F.; BARBEDO, C. J.; MEDINA, P. F. Patologia de Sementes Florestais: Danos, Detecção e Controle, uma revisão. **Summa phytopathol**, v. 45, n. 2, p. 129-133, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/188545>

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: Ministério da Agricultura. Brasília: AGIPLAN, 1985, 289 p.

SARMENTO, M. B.; VILLELA, F. A. Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil. **Informativo Abrates**, v. 20, n. 1/2, p. 39-44, 2010.

SALDANHA, M. A.; MUNIZ, M. F. B.; WALKER, C.; QUEVEDO, A. C.; FANTINEL, V. S. Sanitary and physiological quality of seeds of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 14, p.1-10, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v14i0.6085>

SILVA, L. C. **Avaliação do potencial para armazenamento de sementes de Açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. – Tiliaceae)**. 2004. 28 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

WALKER, C.; MEZZOMO, R.; MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; ARAÚJO, M. M. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Cordia americana* coletadas na planta e no solo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, p. 259-262, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v10i1.2884>