

**UFS - POSGRAP – NEREN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM AGROECOSSISTEMAS**

DISSERTAÇÃO

**QUALIDADE SANITÁRIA E FISIOLÓGICA DE
SEMENTES DE LEUCENA (*Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de
Wit.): UMA LEGUMINOSA DE IMPORTÂNCIA PARA OS
SISTEMAS AGRÍCOLAS DO NORDESTE**

SANDRA SANTOS MENDES

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS



PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - POSGRAP
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO E ESTUDOS EM RECURSOS NATURAIS -
NEREN

**QUALIDADE SANITÁRIA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE
LEUCENA (*Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit.): UMA
LEGUMINOSA DE IMPORTÂNCIA PARA OS SISTEMAS
AGRÍCOLAS DO NORDESTE**

SANDRA SANTOS MENDES

Sob a orientação do Professor Dr.

João Basílio Mesquita

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre
em Agroecossistemas.**

São Cristóvão, SE

Março de 2006.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar ajudando e protegendo minha mãe que possui uma enfermidade no coração e por ter me dado forças para que eu pudesse continuar minha jornada.

A minha mãe pelas palavras de incentivo e encorajamento e pelo constante apoio em todas as minhas decisões, bem como pela sua grande amizade e contribuição para que eu pudesse me tornar o que hoje sou.

À Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade e pela bolsa concedida e ao Departamento de Agronomia por tornar possível a realização de mais uma etapa na minha vida acadêmica que foi a realização do mestrado em Agroecossistemas.

À professora Dra. Renata Silva Mann, pela orientação e pelas valiosas sugestões presentes nesta pesquisa, sem as quais não seria possível à realização deste projeto.

Aos professores do Departamento de Agronomia por compartilharem comigo um pouco da sua compreensão e amizade.

Ao professor Genésio Tâmara Ribeiro por todos os momentos de alegria, simplificando e resolvendo os problemas que estiveram ao seu alcance.

Às minhas amigas pessoais e companheiras de trabalho Allívia Rouse e Erica Moraes pela valiosa contribuição técnica na montagem dos experimentos.

À amiga e pesquisadora da EMBRAPA – CPATC, Salete Rangel pelo apoio e inestimável ajuda, incentivando e sugerindo sempre o melhor.

Ao meu orientador João Basílio Mesquita pelos momentos de paciência e pela confiança.

À pesquisadora Lourdes Leal pelo apoio nas análises estatísticas usadas nesta pesquisa.

A todos os meus amigos da Pós-graduação, em especial a Vandemberg Salvador, pelos almoços e pelas horas de satisfação que me proporcionou durante todo o curso.

A Iaiá Djau pela companhia nos feriados e finais de semana em que eu tive que conduzir os experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Agronomia e do Departamento de Biologia pelos descontraídos momentos vividos e pelos favores a mim concedidos, sem ressalva e sempre com amizade e presteza.

Aos meus alunos da disciplina Fitofisiologia pelo apoio e pela compreensão nas horas em que eu mais precisei.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa e por me ajudarem a vencer mais uma etapa da minha vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Descrição da espécie (<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) R. de Wit.)	2
2.2 O papel da leucena como alternativa a sustentabilidade dos agroecossistemas.....	2
2.3 Sanidade de sementes de espécies florestais.....	4
2.4 Fungos associados às sementes de espécies florestais	5
2.5 Transmissão de fungos associados às sementes de espécies florestais.....	6
2.6 Armazenamento de sementes.	7
2.7 Vigor das sementes.....	8
2.7.1 Condutividade Elétrica.....	9
2.7.2 Envelhecimento acelerado.....	10
2.8 Marcadores isoenzimáticos na avaliação da qualidade de sementes.....	10
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPÍTULO 2 – Qualidade sanitária de sementes de leucena (<i>Leucaena leucocephala</i> Lam).....	20
1 RESUMO.....	20
2 ABSTRACT.....	21
3 INTRODUÇÃO.....	22
4 MATERAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Caracterização da área	22
4.2 Levantamento da micobiota associada às sementes de leucena.	23
4.3 Transmissão dos fungos associados às sementes.....	23
4.4 Colonização quiescente de fungos em plântulas de leucena.	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Levantamento da micobiota associada às sementes de leucena.	24
5.2 Transmissão e colonização latente dos fungos associados às sementes.....	26
6 CONCLUSÕES.....	27
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO 3 – Qualidade fisiológica de sementes de leucena.....	30
1 RESUMO.....	30
2 ABSTRACT.....	31
3 INTRODUÇÃO.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Uso de marcadores isoenzimáticos de esterase na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de leucena.....	36
5.2. Análise fatorial das variáveis IVG, IVE, Condutividade Elétrica e Teor de Água (umidade) das sementes de leucena submetidas a diferentes tipos tempos de armazenamento e de envelhecimento acelerado.....	38
5.3. Análise do Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) das sementes submetidas a diferentes tempos de	

armazenamento e de Envelhecimento acelerado.....	39
5.4. Análise da umidade e condutividade das sementes submetidas a diferentes condições de Envelhecimento Acelerado.....	41
6 CONCLUSÕES.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
3.1 Perfis isoenzimáticos de esterase (EST) em géis de poliacrilamida, de sementes de leucena (<i>Leucaena leucocephala</i> Lam.) armazenadas por 2, 28 e 48 meses e envelhecidas por 24, 48 e 96 horas. UFS, São Cristóvão, 2005.....	36
3.2 Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> , armazenadas e submetidas a diferentes tempos de envelhecimento acelerado. UFS, São Cristóvão, 2005.....	40
3.3 Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de <i>leucena leucocephala</i> , armazenadas e submetidas a diferentes tempos de envelhecimento acelerado. UFS, São Cristóvão, 2005.....	41
3.4 Porcentagem de teor de água de sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> armazenadas e submetidas a diferentes tempos de envelhecimento acelerado. UFS, São Cristóvão, 2005.....	42
3.5 Condutividade elétrica de sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> , armazenadas e submetidas a diferentes tempos de envelhecimento acelerado (a) e tempos de armazenamento (b). UFS, São Cristóvão, 2005.....	43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
2.1	
Freqüência (%) de fungos detectados no teste de sanidade das sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) armazenadas por 2, 28 e 48 meses. UFS, São Cristóvão – SE, 2005.....	25
2.2	
Freqüência (%) de gêneros fúngicos encontrados no teste de colonização quiescente nas sementes de (<i>Leucaena leucocephala</i> Lam.) armazenadas por 2, 28 e 48 meses. UFS, São Cristóvão – SE, 2005.....	25
3.1	
Anova do esquema fatorial 4 x 3 com todas as variáveis testadas	38

RESUMO

MENDES, Sandra Santos. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (lam.) R. de Wit.): uma leguminosa de importância para os sistemas agrícolas do nordeste. São Cristóvão: UFS, 2006. 54p. (Dissertação, Mestrado em Agroecossistemas).

A leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.) é uma espécie arbórea, capaz de contribuir para o melhoramento do solo, além de servir de forragem para o gado, possibilitando ao agricultor uma alternativa para as regiões áridas do Nordeste. É uma espécie bem adaptada às regiões secas, conseguindo se manter verde por grande parte do ano. Sementes de leucena provenientes de duas populações (Reserva Florestal Ibura e *Campus* da Universidade Federal de Sergipe) foram coletadas e armazenadas em diferentes épocas do ano visando a sua utilização como alternativa para a sustentabilidade de agroecossistemas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica e sanitária e a transmissão de fungos associados às sementes armazenadas por 2, 28 e 48 meses em sacos de papel dentro de câmara fria com 40% de umidade a $10 \pm 1^\circ$ C. Os experimentos foram realizados na Clínica Fitossanitária, no Laboratório de Biotecnologia e Cultura de tecidos e no Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Sergipe, no período compreendido entre fevereiro e dezembro de 2005. Para a análise fisiológica das sementes, empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições e as sementes testadas foram previamente submetidas ao envelhecimento acelerado. Testes como Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Condutividade Elétrica (CE), Envelhecimento Acelerado (EA), Grau de Umidade (%U) e isoenzimas foram realizados. No teste de sanidade, nos lotes de 28 e 48 meses de armazenamento, fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram detectados. Já nas sementes do lote de 2 meses de armazenamento, gêneros como *Pestalotiopsis*, *Fusarium* e *Curvularia* foram detectados e observou-se uma maior diversidade de gêneros fúngicos neste lote do que nos demais. Não foi verificada transmissão de fungos das sementes para as plântulas. Na análise fisiológica, verificou-se para as sementes armazenadas por 2 meses os maiores valores de IVG. No teste de CE as sementes com 2 meses de armazenamento submetidas ao EA por 24 horas apresentaram maiores valores. As análises usando marcadores isoenzimáticos mostraram alterações na intensidade de bandas dos perfis eletroforéticos e ausência de alterações nas subunidades protéicas, o que permite inferir que os lotes, apesar de serem de procedências diferentes, provavelmente não são geneticamente divergentes, o que pode justificar as comparações realizadas no presente trabalho. Observou-se, ainda, uma queda nos valores de germinação com o aumento nos períodos de armazenamento, sugerindo uma perda no vigor.

Palavras-chave: transmissão de fungos, patologia de sementes, fisiologia de sementes, espécies florestais, isoenzimas.

ABSTRACT

The *Leucaena* is a tree specie that it is able to improve the soil and can give food for animals. It is an alternative to farmer in dry periods in Northeast. Seeds of leucaena (*Leucaena leucocephala* Lam) from two populations (Reserva Florestal Ibura and *Campus da Universidade Federal de Sergipe*), were collected and storage for different periods as goal their utilization as alternative culture aiming agroecosystem sustainability. The objective of this work was to evaluate the physiological and sanitary seed quality and fungi infection to seedlings obtained of seeds storage for 2, 28 and 48 months. The seeds were storage in paper bags inside a refrigerated chamber with 40% of humidity at $10 \pm 1^\circ \text{C}$ and the experiments carried out in Phytosanitary Clinical, Tissues Culture and Vegetal Breeding Laboratory and Seeds Laboratory of Universidade Federal de Sergipe from February through December, 2005. It was used a statistical totally randomized design with four replications. It was detected in batches of 48 and 28 months fungi from *Aspergillus* and *Penicillium* genus. For seeds storage for 2 months it was detected *Pestalotiopsis*, *Fusarium* and *Curvularia* genus. In concerned to infection of the fungi it was verified the *Aspergillus* was able to cause hypocotyls necrosis on seedlings. For seeds physiological analysis tests as Germination Speed Index (IVG), Emergence Speed Index (IVE), Electrical Conductivity (CE), Accelerate Ageing (EA), Humidity (%U) and isozymes were carried out. It was verified the seeds storage for two months presented higher values of IVG. In the CE test the seeds storage for two months and submitted to accelerate ageing during 24 hours presented the higher values of CE. The isozyme markers showed alteration in patterns of bands intensity and absence of alteration in protein subunit which permit to infer the batches besides from different provenances, probably were not genetically divergent. This fact corroborates to justify the comparison made in this work. It was observed a decreasing in values of germination with increasing storage periods which suggest vigor lost. It was recommended the storage the leucaena seeds for a period maximum of two years for the conditions of present work.

Key-words: fungi infection, seeds pathology, seeds physiology, forests species, isozymes.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O uso de espécies para reflorestamento é limitado devido à falta de informações sobre o comportamento fitossanitário e exigências ecológicas, bem como pela carência de reservas florestais de produção de sementes que sejam manejadas de forma adequada. Uma das principais causas da perda de viabilidade das sementes é a falta de informação a respeito da qualidade sanitária e fisiológica destas, quando são levadas para o campo (DUBOIS,1970). Informações sobre o tempo de armazenamento também são importantes, para que o produtor possa estocar as sementes e usá-las em épocas mais propícias ao plantio.

Pesquisas visando obter informações sobre a biologia e a utilização agrônômica e florestal de espécies vegetais são fundamentais, pois estão diretamente relacionadas às estratégias de estabelecimento das espécies em suas áreas de ocorrência e são imprescindíveis para a formação de mudas em viveiros (FONSECA e RIBEIRO, 1996).

Sabe-se que sementes de baixa qualidade fisiológica e sanitária são capazes de comprometer a sustentabilidade do plantio, causando prejuízos muitas vezes irreparáveis aos agroecossistemas, pois elas são portadoras de grande variedade fúngica. Por essa razão, torna-se importante conhecer a sanidade das sementes para auxiliar na execução dos testes de germinação em laboratório e na formação de mudas em viveiro.

Para que os agroecossistemas sustentáveis possam ser estabelecidos, a escolha da vegetação é muito importante, uma vez que as espécies vegetais exibem graus de tolerância diversificados de acordo com o clima a que estão submetidas. Além disso, deve se levar em consideração à adaptabilidade e a importância econômica e ecológica dessas espécies, bem como a condição das sementes e mudas implantadas no campo. Neste contexto, a leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit.) responde bem às exigências locais para fins de reflorestamento e de reestruturação de agroecossistemas, além de apresentar um grande potencial fornecedor de forragem.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo, avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de *Leucaena leucocephala* provenientes de duas populações (Reserva Florestal do Ibura e *Campus* da Universidade Federal de Sergipe).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie (*Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit.)

A (*Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit.) pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoidae é a espécie mais difundida e que apresenta maior distribuição geográfica no gênero. Árvore ou arbusto com altura de 5 a 18m, diâmetro à altura do peito (DAP) até 30 cm, perene, de crescimento rápido, adaptada às regiões secas e dos trópicos. É originária das Américas e se adaptou bem às condições climáticas do Brasil (KIILL e MENEZES, 2005).

Apresenta vagens agrupadas, lineares, achatadas, com 10-15 cm de comprimento e 2 cm de largura, marrom-escuro, com um bico no ápice; cada vagem contém aproximadamente 20 sementes de coloração marrom brilhante, com 6 mm de comprimento. Regenera-se rapidamente após queimadas ou corte; as árvores têm vida curta, entre 20 e 40 anos, porém o banco de sementes tem longa viabilidade no solo, entre 10 e 20 anos. Cada planta pode produzir até 2.000 sementes por ano. Suas folhas são forrageiras para o gado e a madeira pode ser utilizada como lenha (LORENZI, 2003).

A importância econômica desta espécie foi primeiramente reconhecida pelo seu valor como árvore de sombreamento e adubo verde em plantios de café, chá e seringueira no sudoeste da Ásia. Foi amplamente empregada em reflorestamento e controle de erosão, sendo usada para forragem nas regiões secas, cujas áreas de pastagens são escassas (OAKES, 1968).

A descoberta de variedades e populações de leucena produtoras de madeira, e que apresentem fácil quebra de dormência de suas sementes, é oportuna e importante para a sustentabilidade dos agroecossistemas como fonte alternativa à retirada de espécies nativas.

2.2 O papel da leucena como alternativa a sustentabilidade dos agroecossistemas

Um agroecossistema é um local de produção agrícola – uma propriedade agrícola, por exemplo – compreendido como um ecossistema, dentro do qual os sistemas de produção de alimentos são analisados como um todo, incluindo seus complexos de insumos e às interconexões entre as partes que o compõem visando principalmente a sustentabilidade (GLIESSMAN, 2001).

A manutenção do solo, a fertilidade e a capacidade de produção são cruciais para desenvolver um agroecossistema, que, pode ser considerado sustentável sob vários aspectos. Existe o conceito de sustentabilidade ambiental, que está associado às condições sistêmicas

segundo as quais, em nível regional e planetário, as atividades humanas não devem interferir nos ciclos naturais em que se baseia tudo o que a resiliência do planeta permite e, ao mesmo tempo, não devem empobrecer seu capital natural, que será transmitido às gerações futuras. Inserido na temática sustentabilidade há ainda o princípio da equidade, pelo qual se afirma que cada pessoa (incluindo as gerações futuras) tem direito ao mesmo espaço ambiental, isto é, à mesma disponibilidade de recursos naturais do globo terrestre (MANZINI e VEZZOLI, 2005). Para alguns a sustentabilidade é expressa pela economia, onde quanto mais riqueza o agroecossistema proporciona mais sustentável ele é considerado.

Sistemas agrícolas modernos dependem amplamente da entrada de fertilizantes químicos para a conservação da sua produtividade. Neste contexto, espécies florestais como a leucena têm mostrado um eficiente mecanismo de fixação de nitrogênio relatando mudanças favoráveis às características do solo, além de promover sua conservação reduzindo a degradação e favorecendo a produção sustentável (INGRAM, 1990).

A utilização de leguminosas arbustivas ou arbóreas como a leucena em áreas isoladas ou em consórcio com gramíneas tem se mostrado viável para preservar características importantes do solo. Esta espécie possui a capacidade de manter-se verde, mesmo durante a maior parte da época seca, por apresentar sistema radicular profundo, que propicia a reciclagem dos nutrientes do subsolo, como também a absorção de água das camadas profundas do solo. Outras vantagens, tais como habilidade para crescer em solos de baixa fertilidade, rápida dispersão, ciclo longo, alto valor alimentício e excelente aceitabilidade pelos animais, mesmo no início da fase vegetativa, fazem da leucena uma espécie com potencial para uso em agroecossistemas (LIMA e EVANGELISTA, 2006).

Seu uso na alimentação animal pode elevar sensivelmente a produtividade dos rebanhos em regiões tropicais onde as pastagens predominantes não são capazes de atender às demandas de energia, proteína e minerais, especialmente onde a estação seca é mais prolongada. Além de forragem de boa qualidade, a leucena produz grande quantidade de sementes viáveis, o que facilita sua propagação em larga escala (VEIGA e SIMÃO NETO, 1996).

Em razão da capacidade de se desenvolver em regiões de precipitação variável, sugere-se a utilização da leucena na recuperação de áreas degradadas, para a conservação do solo (DRUMOND *et al*, 1997). Além disso, a leucena possui um sistema radicular bastante desenvolvido com a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* e solubilização de fósforo por meio de *Mycorhizae*, graças à associação de fungos às raízes mais finas (CARDOSO, 1980; KLUTHCOUSKI, 1980).

Estes aspectos relacionados ao seu rápido crescimento e aos seus usos múltiplos como forragem, lenha, celulose, madeira e fertilizante, a leucena, em geral tem despertado interesse de agricultores e indústrias, sendo cultivada em várias regiões do mundo.

2.3 Sanidade de sementes de espécies florestais

A sanidade da semente refere-se, primariamente, à presença ou ausência de agentes patogênicos, tais como fungos, bactérias, vírus e nematóides. Entretanto, pode também estar relacionada a anomalias decorrentes de alterações nutricionais e condições climáticas adversas, ocorridas no campo, no processamento ou no armazenamento (BRASIL, 1996).

Entre os organismos presentes nas sementes e que podem ser transmitidos para plântulas, o grupo dos fungos é o mais numeroso, seguido das bactérias, vírus e alguns nematóides (MACHADO, 1988).

No Brasil, os poucos trabalhos publicados têm apenas relacionado os microrganismos que ocorrem nas sementes de espécies florestais, sem avaliar, contudo, os seus efeitos sobre a germinação e desenvolvimento das plantas. Para a obtenção de uma boa muda é necessário o controle da qualidade sanitária das sementes utilizadas, pois estas poderão servir como veículo de propagação e disseminação de patógenos capazes de dizimar plantações inteiras de agroecossistemas.

Um outro fator que pode influenciar a produção de mudas é a qualidade fisiológica da semente. A germinação e o vigor são os principais fatores que podem garantir a produção de uma muda de boa qualidade. A avaliação correta desses fatores é imprescindível para se estimar o potencial de desempenho das sementes no campo (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

Desta forma, julga-se de extrema importância o fato de que os danos decorrentes da associação de patógenos com sementes e da baixa qualidade fisiológica, não se limitem apenas a perdas diretas de populações de plantas no campo, mas influenciem também em uma série de outras implicações que, de forma mais acentuada, podem levar a danos irreparáveis a todo o agroecossistema (MACHADO, 2000).

De acordo com a concepção do manejo de doenças de plantas, dentre as inúmeras medidas que podem ser empregadas pelo agricultor, o uso de sementes sadias ou com qualidade sanitária, dentro de padrões pré-estabelecidos, é de grande importância para garantir a sustentabilidade do agroecossistema.

2.4 Fungos associados às sementes de espécies florestais

O primeiro trabalho com fungos associados a sementes de espécies florestais foi realizado por GIBSON (1957) que trabalhou com sementes de *Pinus patula* Mor. e relatou que fungos como *Mucor* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Trichotecium* sp. presentes nas sementes podem, sob condições favoráveis, invadir os tecidos das sementes germinadas e matar as plântulas.

No Brasil, o primeiro trabalho de levantamento de fungos associados à sementes de espécies florestais foi desenvolvido por LASCA, *et al.*, (1971) com sementes de *Pinus* spp. Foram detectados vários gêneros fúngicos que podem ser patogênicos, dentre eles *Fusarium* sp., *Diplodia* sp., *Botryodiplodia* sp., *Alternaria* sp. e *Helminthosporium* sp. Posteriormente, outros trabalhos mostraram que diversos microrganismos, patogênicos ou não, podem estar associados às sementes de espécies florestais – com predominância de fungos (LASCA *et al.*, 1978; URBEN *et al.*, 1982; HOMECHIN *et al.*, 1986, 1993 e 1995; MUCCI e LASCA, 1986; CARNEIRO, 1986, 1990; DAYAN, 1986; MASCHIO, *et al.*, 1990; SALES, 1996; SANTOS e CASTRO, 1993; NOBRE, 1994; NETO, *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1997; FAIAD, 1995 e 1998).

Em sementes de barbatimão, ipê roxo e ipê amarelo, coletadas nas árvores e no solo, observou-se que os gêneros dos fungos a elas associados, de maneira geral, não variavam com as espécies em estudo, sendo que *Fusarium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium* e *Trichoderma* foram os gêneros mais frequentes (MARTINS, 1991).

Em trabalhos com sementes de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* (Fr. All.) Engl.) coletadas em 122 árvores nos Estados do Piauí e Bahia foram detectadas 25 espécies e/ou gêneros fúngicos, sendo que os mais frequentes foram *Aspergillus niger* Van. Tieghm., *Aspergillus flavus* Link., *Penicillium* sp., *Alternaria alternata* (Fr) Keissler, *Rhizopus* sp., *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp. e *Lasiodiplodia theobromae* (MEDEIROS *et al.*, 1996)

MENDES *et al.* (2005), trabalhando com sementes de sabiá, verificaram que a espécie fúngica *Fusarium solani* e o gênero *Pestalotiopsis* sp. além de terem sido detectados nas sementes, foram patogênicos às plântulas, quando artificialmente inoculados.

Os fungos encontrados sobre as sementes apresentam alta velocidade de crescimento micelial e de esporulação, o que pode facilitar a contaminação de outras sementes durante os

períodos de incubação das mesmas (FERREIRA, 1989) sendo, portanto, importante o conhecimento da sanidade e transmissão de fungos pelas sementes.

2.5 Transmissão de fungos associados às sementes de espécies florestais

Potencialmente, todos os organismos fitopatogênicos podem ser transportados pelas sementes, embora a transmissão de inúmeros deles, por esse meio, não seja conhecida. Dentro do grupo dos fungos, os filamentosos são os que causam mais problemas às plantas (MACHADO, 1988).

Para que se entenda a dinâmica de transmissão de patógenos por sementes, é importante que se tenha conhecimento prévio das diferentes formas como os patógenos são veiculados em um lote (MACHADO, 1999).

A associação de fungos com sementes não implica no surgimento de doenças após a semeadura, embora praticamente todos os fitopatógenos associados às mesmas sejam potencialmente capazes de causar doenças. Caso isso aconteça ocasionando o surgimento de plantas doentes no campo, tem-se o fenômeno da transmissão.

Algumas vezes, fungos associados às sementes podem estar presentes nos tecidos das plantas após a germinação sem causar sintomas de doenças. Isso caracteriza a presença de colonização latente (MENTEN, 1986 e 1995).

A deterioração de sementes de culturas agrônômicas causadas pela presença de fungos vem sendo extensivamente estudada, no entanto, pouca atenção tem sido dada aos fungos associados às sementes de árvores e às relações entre eles e as doenças que causam em suas mudas (IBDF, 1985).

A maioria dos trabalhos sobre a disseminação de patógenos de espécies florestais, via semente, foi realizada no Canadá, Estados Unidos e África, sendo as coníferas as espécies mais estudadas. Esses trabalhos referem-se à população fúngica associada às sementes e ao efeito desta população na germinação e desenvolvimento inicial das plântulas (SALES, 1996).

Na maioria das vezes, o controle prático na disseminação destes fungos não está na redução ou eliminação de inóculo, mas sim na manutenção das sementes durante o armazenamento, sob condições que não permitam o desenvolvimento destes num nível suficiente para causar danos (FERREIRA, 1989).

2.6 Armazenamento de sementes.

O conhecimento do comportamento das sementes no armazenamento permite a utilização de condições adequadas para a conservação da viabilidade e vigor após a colheita e a elaboração de programas para a conservação de bancos de germoplasma em longo prazo (DAVIDE *et al.*, 2003).

O armazenamento tem por objetivo conservar as sementes, preservando suas características físicas, fisiológicas e sanitárias, para posterior semeadura e obtenção de plantas sadias após a germinação. Os objetivos das sementes armazenadas podem ser diversos, desde a formação de plantios comerciais, até bancos de dados de genes de florestas nativas. Dependendo do objetivo, pode ser necessário conservá-las por períodos curtos ou longos (FLORIANO, 2004).

Na maioria das espécies vegetais de importância econômica, a viabilidade e o vigor das sementes podem ser conservados pela redução do seu teor de água e pela temperatura do ambiente (FONSECA e FREIRE, 2003), no entanto isso não é regra, principalmente tratando-se de espécies de caráter recalcitrante.

Dependendo da espécie, as sementes de árvores podem permanecer vivas por períodos que vão de apenas alguns dias até décadas. Espécies pioneiras geralmente possuem sementes que mantêm sua viabilidade com teores de umidade entre 8 e 12%, podendo ser armazenadas em baixas temperaturas e umidade do ar, ficando pouco suscetíveis à deterioração por agentes bióticos ou pela queima de suas reservas; espécies clímax normalmente apresentam sementes que se mantêm viáveis somente com altos teores de umidade (30 a 40%) e por curtos períodos, praticamente impossibilitando o armazenamento, devendo ser semeadas logo após sua colheita e beneficiamento (NAPPO *et al.*, 2001).

Além do tratamento da própria semente, são necessários embalagens e ambientes apropriados. Os principais meios utilizados para o armazenamento de sementes são a câmara fria, a câmara seca e a câmara fria seca, que se adaptam à maioria das situações (VIEIRA *et al.*, 2002).

No armazenamento, a velocidade do processo deteriorativo pode ser controlada em função da longevidade, da qualidade inicial das sementes e das condições do ambiente. Como a longevidade é uma característica genética inerente à espécie, somente a qualidade inicial das sementes e as condições do ambiente de armazenamento podem ser manipuladas. (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

2.7 Vigor das sementes

A qualidade fisiológica das sementes é influenciada em toda a sua vida desde a fertilização até o momento da sementeira. Em ordem cronológica, os principais fatores que afetam a qualidade são: genótipo, condições ambientais durante o desenvolvimento das sementes, posição da semente na planta mãe, época e técnicas de colheita, condições de armazenamento e tratamentos pré-sementeira (BASU, 1995). Portanto, a qualidade fisiológica é adquirida durante os processos de desenvolvimento e pode ser perdida por processos deteriorativos, que podem iniciar ainda nessa fase. Quando as sementes deterioram, elas perdem vigor progressivamente, apresentando redução na velocidade e uniformidade de emergência, menor resistência a condições adversas, decréscimo na proporção de plântulas normais e, finalmente, perdem a viabilidade ou capacidade de germinar (HALMER e BEWLEY, 1984).

O vigor das sementes é o reflexo de um conjunto de características ou propriedades que determinam o seu potencial fisiológico, ou seja, a capacidade de apresentar desempenho adequado quando expostas a diferentes condições ambientais. Diante dessas constatações, foram desenvolvidos vários métodos para se testar o vigor de sementes como complemento ao teste de germinação. O teste de envelhecimento acelerado ou artificial é um desses procedimentos (MARCOS FILHO, 1994).

Outra forma de determinação da qualidade fisiológica pode ser expressa pelo conteúdo de umidade de sementes que se baseia na perda de peso das mesmas, por meio da secagem em estufas, e tem a finalidade de determinar o teor de água das sementes, o que vai auxiliar na definição de seu armazenamento. Determina ainda se a semente deve sofrer uma maior perda de umidade por meio de exposição ao sol ou à sombra (SCHUMACHER *et al.*, 2002)

Apesar dos testes de vigor não apresentarem total possibilidade de padronização de metodologia e de interpretação dos resultados, autores como (AOSA, 1983; TEKRONY, 1983) são unânimes em afirmar que estes testes devem apresentar as seguintes características: a) reprodutibilidade dos resultados; b) interpretação e correlação com a emergência sob certas condições; c) rapidez; d) objetividade; e) simplicidade e f) viabilidade econômica. Neste sentido, testes como Condutividade Elétrica, Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Umidade (%U) e Envelhecimento Acelerado (EA) são capazes de auxiliar na interpretação do vigor das sementes (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

2.7.1 Condutividade Elétrica

A perda da integridade das membranas celulares é a primeira manifestação de redução ou perda de qualidade das sementes e está diretamente associada ao mecanismo de envelhecimento de sementes. A permeabilidade das membranas, relacionada diretamente com a sua integridade, contribui para detectar diferentes graus de deterioração das sementes e a conseqüente perda da viabilidade e vigor (BEWLEY e BLACK, 1994). Sementes deterioradas liberam maiores quantidades de substâncias, como açúcares e íons, quando comparadas às menos deterioradas, por ocasião da embebição dessas sementes, indicando uma maior ou menor permeabilidade das membranas (TOLEDO e MARCOS-FILHO, 1977).

Testes que avaliam a integridade das membranas são, teoricamente, os mais sensíveis para estimar o vigor das sementes. Neste sentido, pode-se destacar o teste de condutividade elétrica, no qual a qualidade das sementes é avaliada indiretamente por meio da determinação da quantidade de lixiviados na solução de embebição das sementes. Os menores valores, correspondentes à menor liberação de exsudatos, indicam alto potencial fisiológico (maior vigor), revelando menor intensidade de desorganização dos sistemas membranais das células (VIEIRA *et al.*, 2002). Quando sementes são colocadas para embeber em água, ocorre liberação de açúcares, ácidos orgânicos e íons H⁺. Os íons H⁺ acidificam o meio e provocam a diminuição do pH do exsudato das sementes. Sementes deterioradas liberam maior quantidade desses íons H⁺ e conseqüentemente resultam em menores valores de pH. Por outro lado, as sementes menos deterioradas apresentam baixa lixiviação e não promovem grandes alterações de pH do meio.

A quantidade de exsudados da semente na água de embebição pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento no momento da colheita, bem como pela idade da semente (VIEIRA e CARVALHO, 1994) e presença de microrganismos, dentre outros fatores.

2.7.2 Envelhecimento acelerado

O envelhecimento acelerado é um teste de vigor baseado na simulação de fatores ambientais adversos (temperatura e umidade relativa elevadas), que são tidos como causadores da deterioração das sementes. Os processos de deterioração ocorridos neste teste são semelhantes aos que ocorrem no envelhecimento natural das sementes, porém, a uma velocidade acelerada (DELOUCHE e BASKIN, 1973. TEKRONY, 1993. MARCOS FILHO, 1994).

O teste de envelhecimento acelerado consiste em se verificar o desempenho das sementes, após serem submetidas às condições desfavoráveis de temperatura e umidade e constitui-se numa metodologia auxiliar, cujo emprego se mostra bastante promissor em sementes florestais, não só na área de tecnologia e análise de sementes como também em outras áreas (PIÑA-RODRIGUES, 1984).

Geralmente, as sementes mais vigorosas retêm a capacidade de produzir plântulas normais e apresentam germinação mais elevada após serem submetidas ao envelhecimento acelerado, enquanto que as de baixo vigor se caracterizam por apresentar maior redução de viabilidade. Esta técnica, além de ter utilidade como teste de vigor, também pode ser utilizada como meio para avaliar a eficácia da conservação *ex situ* de sementes de espécies florestais (GARCIA *et al.*, 2004).

2.8 Marcadores isoenzimáticos na avaliação da qualidade de sementes

No estudo e monitoramento da qualidade fisiológica de sementes, é fundamental o conhecimento dos processos que ocorrem durante a germinação e deterioração das mesmas.

Os avanços em biologia molecular, incorporados ao controle de qualidade de sementes, têm contribuído para o desenvolvimento de técnicas e identificação de marcadores, que, quando associados aos testes fisiológicos, auxiliam na elucidação dos eventos bioquímicos que afetam a qualidade fisiológica.

As perdas na qualidade de sementes estão relacionadas à degradação de macromoléculas, tais como: proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e, conseqüentemente, à diminuição de atividades bioquímicas de sementes (COOLBEAR, 1995). As diversas reações metabólicas que envolvem síntese e degradação de moléculas durante o desenvolvimento e a germinação e deterioração de sementes têm sido estudadas, visando identificar marcadores que revelem a qualidade fisiológica de sementes e possibilitem o desenvolvimento de testes rápidos, para monitorar a germinação e o vigor das mesmas .

Podem ocorrer mudanças na atividade de enzimas hidrolíticas, em diferentes sementes durante o armazenamento, as quais afetam tanto o vigor como a viabilidade. Não é conhecido se mudanças em atividade enzimática aparecem independentemente, baseadas na suscetibilidade individual da proteína para estresse físico ambiental presentes durante o armazenamento ou se elas são o resultado de um simples evento, tais como ativação de proteases ou outros processos celulares, que poderiam finalmente afetar a função de muitas enzimas (SHATTERS *et al.*, 1994).

Essas mudanças provavelmente podem ocorrer devido à ação de algumas enzimas hidrolíticas e desidrogenases que são ativadas, mesmo em boas condições de armazenamento. As lipases e esterases podem mostrar alguma atividade em umidades relativas abaixo de 10% (BERNAL-LUGO e LEOPOLD, 1998).

A deterioração de sementes pode ser caracterizada como um processo inevitável, sendo, no entanto, possível retardar a taxa de deterioração por meio de práticas que conduzam a um ótimo armazenamento. A deterioração é também considerada um processo irreversível, porém alguns mecanismos de pré-condicionamento podem melhorar a germinação e o vigor de sementes (DELOUCHE e BASKIN, 1973).

Um interessante estudo foi realizado em sorgo. Os autores verificaram que sementes armazenadas a 17% de teor de água constante e a 30°C mostraram um pequeno aumento no vigor após seis dias de armazenamento e, então, um declínio gradual na qualidade de sementes, assim que foram envelhecendo a partir de 50 dias de armazenamento. Uma das mais importantes características desse estudo foi que as avaliações foram feitas enquanto as sementes perdiam vigor, porém não sua capacidade de germinar. No final do período de armazenamento, somente 10% do total da germinação havia sido perdida, indicando que as mudanças nas enzimas foram os primeiros eventos no processo de envelhecimento (PERL *et al.*, 1978).

A eletroforese, por meio da detecção de alterações na composição protéica e de enzimas específicas, pode ser uma eficiente ferramenta para o acompanhamento da qualidade das sementes. CHAUHAN *et al.* (1985), estudando variação eletroforética de proteínas e enzimas de soja e cevada em relação à qualidade das sementes, observaram que bandas de proteínas e enzimas (esterases, fosfatase e transaminases) funcionam como marcadores moleculares na avaliação da qualidade. Também VIEIRA (1996) encontrou como promissores os indicadores do estado de deterioração de sementes de algodoeiro que causaram variações eletroforéticas das enzimas esterase, glutamato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, enzima málica, peroxidase e 6-fosfagluconato.

Com base nessas mudanças que ocorrem nas células e no metabolismo básico das sementes, como perda de vigor e viabilidade, vêm sendo realizados diversos trabalhos para identificar os possíveis marcadores indicativos da deterioração. Para a obtenção de material de pesquisa tem sido comumente utilizado o envelhecimento artificial por meio de altas temperaturas e umidades ou, quando possível, escolhido material que represente diferentes estádios de deterioração.

A deterioração de sementes pode resultar em mudanças acentuadas em reservas nutritivas e na atividade de enzimas capazes de degradá-las. Dependendo da espécie de sementes, a perda da capacidade de sintetizar hidrolases pode acompanhar a perda de viabilidade ou precedê-la. No entanto, a perda de reservas nutritivas principais não é uma consequência importante da deterioração, mas a capacidade de utilizar essas reservas pode ser. O estado de enzimas, que degradam reservas, não é normal em sementes deterioradas (DESAI *et al.*, 1997).

Os testes mais sensíveis para medir a deterioração de sementes são aqueles que medem a atividade de certas enzimas associadas com quebras de reservas nutritivas ou biossíntese de tecidos novos durante a germinação. (COPELAND e MCDONALD, 1995).

Diversas mudanças na estrutura macromolecular das enzimas podem contribuir para a sua menor eficiência. Elas podem sofrer mudanças na composição por perda ou ganho de certos grupos funcionais, por oxidação de grupos sulfidrila ou por conversão de aminoácidos dentro da estrutura protéica (COPELAND e MCDONALD, 1995).

As esterases são o mais importante grupo de enzimas na germinação de amendoim. (AUNG e MCDONALD, 1995). Os autores avaliaram a atividade de esterases durante a deterioração de sementes de amendoim, encontrando decréscimo na sua atividade total, com o aumento de deterioração tanto em sementes embebidas como não embebidas. No entanto, com base nos perfis de bandas, observaram que essas mudanças não foram uniformes entre todas as espécies de isoesterases. Sete isoenzimas aumentaram e quatro diminuíram durante a embebição. Os autores concluíram que isoesterases específicas são suscetíveis à deterioração durante o envelhecimento de sementes de amendoim e que outras isoesterases associadas à germinação são preferencialmente sintetizadas durante a embebição.

Avaliando esse mesmo grupo de enzimas, alguns autores têm observado que o padrão de bandas não é uniforme nos estádios de envelhecimento. BRANDÃO JÚNIOR *et al.* (1999) verificaram diminuição da intensidade de um grupo de bandas e aumento de outras com o envelhecimento de sementes de milho. Estes autores explicaram o aparecimento de novas bandas, como sendo devido à ação de fungos de armazenamento.

Analisando as tentativas de se correlacionar à redução na viabilidade de sementes com alterações na atividade de diferentes grupos de enzimas específicas, é possível notar que existe uma coerência nos resultados obtidos por uma mesma espécie e em muitos casos entre espécies diferentes para o comportamento de determinadas enzimas. O uso de alterações em enzimas constitui-se uma ferramenta de grande valor para o controle de qualidade de

sementes, permitindo diagnóstico do estado fisiológico da semente e em determinados casos, inferir sobre causas da perda de viabilidade e vigor.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOSA. ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. *Seed vigor testing handbook*. East Lansing, 1983. 93p. (Contribution 32).

AUNG, U.T.; MCDONALD, M.B. Changes in esterase activity associated with peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed deterioration. *Seed Science Technology*, Zurich, v.23,p.101-111,1995.

BASU, R. N. Seed viability. In: BASRA, A. S. (Ed.) **Seed quality: basic mechanisms and agriculture implications**. New York: Food Products Press, 1995. p. 1-44.

BERNAL-LUGO, I.;LEOPOLD, A.C. The dynamics of seed mortality. *Journal of Experimental Botany*, v.49, n.326, p.1455-1461, 1998.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. *Seed physiology of development and germination*. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BRANDÃO JÚNIOR., D.S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. *Revista Brasileira de Sementes*, v.21, n.1, p.114-121, 1999.

BRASIL, *Regras Para Análise de Sementes*. Brasília: Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal, 1996. 445p.

CARDOSO, E.P. Leucaena: a leguminosa do futuro. *A Granja*, Porto Alegre, v. 36,n. 395,p. 28-36, 1980.

CARNEIRO, J.S. Micoflora associada a sementes de essências florestais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília,v.11, n.3, p.557-66. 1986.

CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 588 p.,2000.

CHAUAN, K.P.S.;GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. *Seed Science and Technology*, Zürich, v. 13, n.3, p.629-41, 1985.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: *Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications* (ed. Basra, A.S.).p. 223-275. Food Products Press, 1995.

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. *Seed Science and Technology*. New York: Chapman and Hall,1995.409p.

DAVIDE, A.C.; CARVALHO, L.R.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. *Cerne*, v.9, N.1, p.029-035. 2003.

DAYAN, M.P. Fungi associated with different forest tree seed of the forest research seed bank. *The Embryon*, London, v.2, n.1, p.28-39. 1986.

DELOUCHE, J. C., BASKIN, C. C. Accelerate aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.1, n.2, p. 427-52. 1973.

DESAI, B.B., KOTTECHA, P.M. SALUNKHE, D.K. *Seeds Handbook: Biology, Production, Processing and Storage*. New York. Marcel Dekker Inc. 1997, 627p.

DRUMOND, M. A. ; LIMA, A.Q.; LIMA, P.C.F. Comportamento silvicultural de algumas espécies arbóreas na bacia do rejeito da Mineração Caraíba. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3.,1997, Ouro Preto. *Trabalhos voluntários...* Viçosa, MG:UFV, 1997.p. 403-406.

DUBOIS, I. Características e distribuição geográfica das florestas naturais de folhosas. Reflorestamento para produção de madeira de serraria. Tendências e possibilidades. *Silvicultura em São Paulo*, São Paulo, v.7, n.2, p.111-26. 1970.

FAIAD, M.G.F., SALOMÃO, N., PADILHA,S. Levantamento da população fúngica associada às sementes de *Spondias tuberosa* Anacardiaceae e sua redução através de tratamentos fungicidas. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.21, n.3/4, p.248. 1995.

FAIAD, M.G.F., URBEN, A.F., PADILHA, L.S. SANTOS,M.F. Ocorrência de fungos em sementes de espécies nativas da região da Serra da Mesa-GO. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.23, p.240,. Suplemento1998.

FERREIRA, E. M.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª ed. EMBRAPA, 1998, Brasília. p. 220.

FERREIRA, F.A. *Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa, MG: SIF, 570p. 1989.

FLORIANO, E. P. *Armazenamento de sementes florestais*. Caderno Didático nº1, 1ª edição. Santa Rosa, 10p. 2004.

FONSECA, C.F.; RIBEIRO, J. F. Fruteiras nativas do cerrado: estágio atual e perspectivas futuras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1, 1996, Cruz das Almas, Anais. Cruz da Almas EMBRAPA-CNPMF/SBF,1996. p. 63-75.

FONSECA, S.L.C. & FREIRE, H.B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia*. Campinas, v. 62, n.2, p.297-303, 2003.

GARCIA, L..C.; NOGUEIRA A. C.; ABREU, D. C. A. *Influência do envelhecimento acelerado no vigor de sementes de Anadenanthera colubrina (Vellozo) Brenan – Mimosaceae* Ciência Florestal, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 85-90, 2004.

GIBSON, I.A.S. Saprophytic fungi as destroyers of germinating pine seeds. *East African Agricultural Journal*, Nairobi, 203-6. 1957.

GLIESSMAN, S. R. *Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável*. 2ª ed. Porto Alegre. Ed. UFRGS, 2001.

HALMER, P.; BEWLEY, J.D. A physiological perspective on seed vigour testing. *Seed Science Technology*, 12:561-575.1984.

HOMECHIN, M., FONSECA, E.P., TAKAHASHI, L.S.A. Sanidade e germinação de pau-Pólvora (*Trema micrantha* (L.) Blum. *Informativo ABRATES*, Brasília, v. 5, n.2, p.202, 1995.

HOMECHIN, M., TAKAHASHI, L.S.A., FONSECA, E.P., MIGLIORANZA, E. Microorganismos associados a sementes de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.) colhidas em diferentes locais e submetidas ao despulpamento. *Informativo ABRATES*, Brasília, v.3, n.3, p.106, 1993.

HOMECHIN, M., PIZZANATO, 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 Phytopatologica*., Piracicaba, v.12, n.1/2, p.102-12, 1986.

INGRAM, J. The role of trees in maintaining and improving soil productivity. Technical paper 279. Commonwealth Science Council. 1990.

IBDF INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL. *O setor florestal brasileiro, 79/85*. Brasília, DF: 1985. 30p.

KIILL, L. H. P.; MENEZES, E.A. (Ed.). *Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o Semi Árido Brasileiro*. EMBRAPA Semi-Árido. Brasília, DF. 2005. 340p.

KLUTHCOUSKI, J. *Leucena: alternativa para pequena e média agricultura*. Brasília: Embrapa-DID, 1980.12p.(Embrapa- CNPAF. Circular técnico, 6).

LASCA, C.C., SAMPAIO, A.S., CINTRA, A.F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. *O Biológico*, São Paulo, v.37, n.11, p.287-96, 1971.

LASCA, C.C., SAMPAIO, A.S., CINTRA, A.F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus elliottii* Engelm produzidas no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.4, n.1, p.12-3, 1978.

LIMA, J. A.; EVANGELISTA, A. R. *Leucena (Leucaena leucocephala)*. *Boletim de Extensão*. UFLA, 2006. Disponível em http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol_64.pdf.> Acesso em: 30 jan. 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. *Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas*, 1, 1, São Paulo, Nova Odessa, 2003, (p.198).

MACHADO, J.C. *Patologia de sementes: fundamentos e aplicações*. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106p.

MACHADO, J.C. *Manejo sanitário de sementes no controle de doenças*. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999.

MACHADO, J.C. *Tratamento de sementes no controle de doenças*. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000.

MANZINI, E. VEZZOLI, C. O desenvolvimento de produtos sustentáveis. 1ª ed. Editora da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2005.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). *Testes de vigor em sementes*. Jaboticabal: Funep, 1994. p.133-150

MARTINS, S. E. *Aspectos fitossanitários e fisiológicos de sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo de algumas localidades do Sul de Minas Gerais*. Lavras, MG: ESAL, 1991. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1991.

MASCHIO, L.M.O., MACEDA, A., RAMOS, A. Fungos em sementes de espécies florestais com potencial silvicultural no Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6, 1990, Campos do Jordão. *Anais...* São Paulo: Soc. Bras. Silvicultura, 1990. p.84.

MENDES, S. S.; SANTOS, P.; SANTANA, G. C.; RIBEIRO, G.T.; MESQUITA, J.B. Levantamento, patogenicidade e transmissão de fungos associados às sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). *Revista Ciência Agronômica*, vol. 36, nº 1, jan-abr., 2005:118-122.

MENTEN, J.O.M.M. Importância da semente na transmissão de patógenos. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2, 1986, Campinas. *Anais...* São Paulo: Fundação Cargill, 1986. p. 27-40.

MENTEN, J.O.M.M. *Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. 320p.

MUCCI, E.S.F., LASCA, C.C. Flora fúngica de sementes de essências florestais nativas. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v.11, n.2, p.352-3, 1986.

NAPPO, M. E.; GOMES, L. J. CHAVES, M. M. F. Reflorestamentos mistos com essências nativas para recomposição de mataas ciliares. *Boletim Agropecuário*, n.30, p. 5-31, UFLA, Lavras, 2001.

NETTO, D. A. M.; FAIAD, M. G. R. Viabilidade e sanidade de sementes de espécies florestais. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília. V. 17, p.75-80. 1995.

NOBRE, S.A.M *Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de ipê roxo (Tabebuia*

impetiginosa) e angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*) em função de tratamentos diferenciados de frutos e sementes. Lavras, MG: ESAL, 1994. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1994.

PERL, M.L.; LUNA, I.; GELMOUND, H. Biochemical changes in sorghum seeds affected by accelerated ageing. *Journal of Experimental Botany*, v.29, p. 497- 509, 1978.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Perspectivas da utilização do teste de envelhecimento precoce em sementes de essências florestais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS, 1984, Curitiba. *Anais...* Curitiba: UFPR/IUFRO, 1984. p. 291-313.

OAKES, A. J. *Leucaena leucocephala*: description, culture, utilization. *Advancing Frontiers of Plant Sciences*, New Delhi, n. 20, p. 1-114, 1968.

SALES, N. L. P. *Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê amarelo, ipê roxo e barbatimão*. Lavras, MG: ESAL, 1996. 89p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1996.

SANTOS, G.J.C., CASTRO, H.A. Fungos associados à sementes de aroeira do sertão (*Astromium urundeuva* (Fr. All.) Enggler). *Informativo ABRATES*, Brasília, v. 3, n.3, p.107, 1993.

SANTOS, M. F.; RIBEIRO, W.C., FAIAD, M.G.R., SANO, S.M. Fungos associados às sementes de baru (*Dpteryx alata* Vog.). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 19, n. 1, p. 135-9, 1997.

SHATTERS JR., R.G., ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Science Research*, v.4, p.33-41, 1994.

SCHUMACHER, M. V.; HOPPE, J. M.; FARIAS, J. A. Manual de instruções para a coleta, beneficiamento, armazenamento e análise de sementes florestais. AFUBRA, Universidade Federal de Santa Maria, 26p. 2002.

TEKRONY, D.M. Accelerated aging test. *Journal of Seed Technology*, v.17, p.110-120, 1993.

TOLEDO, F.F.; MARCOS-FILHO, M. *Manual das sementes, tecnologia da produção*. São Paulo: Agronomia Ceres. 1977. 224p.

URBEN, A.F., WETZEL, M.M.V. da S., CICERO, S.M. Ocorrência de fungos em sementes de seringueira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.17, n.11, p.1633-7, 1982.

VEIGA, J.B., SIMÃO NETO, M.. *Leucena na alimentação animal: recomendações básicas*. Belém, PA: EMBRAPA Amazônia Oriental. 4p. (EMBRAPA - CPATU. Recomendações básicas, 019), 1996.

VIEIRA, M.G.C.G. *Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)*. Lavras: UFLA.127p. (Tese de Doutorado), 1996.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M.; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). *Teste de vigor em sementes*. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.31-47.

VIEIRA, R.D.; PENARIO, A. L.; PERECIN, D.; PANOBIANCO, M. *Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja*. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 37, n. 9, p. 1333-1338, set. 2002

CAPITULO 2

QUALIDADE SANITÁRIA DE SEMENTES DE LEUCENA (*Leucaena leucocephala* Lam.)

1 RESUMO

MENDES, Sandra Santos. **Qualidade sanitária de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.)**. In: ____. **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de leucena (*leucaena leucocephala* (lam.) R. de wit.): uma leguminosa de importância para os sistemas agrícolas do nordeste**. 2005. Cap.2 Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

O vigor pode ser afetado por microrganismos presentes em sementes. Esse efeito é bastante evidente quando se trata de organismos que colonizam os tecidos das sementes. O presente trabalho teve como objetivo conhecer a microbiota associada às sementes de leucena armazenadas por (2, 28 e 48 meses), e avaliar a transmissão e sua potencialidade de causar doenças nas plântulas. Para conhecer a microbiota, empregou-se o teste de sanidade, no qual 400 sementes foram utilizadas, divididas em duas amostras (com e sem desinfestação superficial). As sementes foram dispostas em caixas plásticas tipo gerbox sobre folhas de papel de filtro esterilizado e umedecido com água autoclavada contendo 200ppm de tetramicina. No teste de transmissão 100 sementes foram semeadas em caixas de polietileno contendo vermiculita autoclavada. As avaliações foram realizadas diariamente após o quarto dia de emergência, observando os sintomas. Para avaliar a colonização latente, as plântulas que não apresentaram sintomas no teste de transmissão foram seccionadas, desinfestadas, tratadas com paraquat e isoladas em BSA (batata-sacarose-ágar) + rosa bengala para a observação do crescimento de fungos. Para o teste de sanidade, os gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium* foram detectados em todos os lotes de sementes armazenados. Houve uma maior diversidade de gêneros fúngicos nas sementes armazenadas por 2 meses, com a ocorrência dos gêneros *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Acrophialophora* e *Curvularia*. Não foi verificada transmissão dos fungos detectados para as plântulas. Observou-se colonização latente em plântulas provenientes de sementes armazenadas por 2 meses que apresentaram uma maior diversidade dos gêneros fúngicos *Penicillium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Colletotrichum* e *Aspergillus niger*.

Palavras-chave: transmissão, colonização latente, patologia de sementes.

2 ABSTRACT

The seed vigor could be affected by microorganisms presented on seeds. This effect is evident when can be present organisms that colonize tissues. The present work was carried out to know the mycobiota associated to seeds of leucaena storage for three different times (2, 28 and 48 months), and to evaluate the infection as well the potentiality of fungi to cause deceases on seedlings. In case of not infection it was used latent colonization test taking sections of live tissues after 40 days of emergence. In sanity test it was used 400 seeds divided in two samples (with disinfection and without disinfection). The seeds were disposed in gerbox on sterile paper sheets moisture with sterile water added 200ppm of tetramicine. In infection test 100 seeds were distribute on gerbox with vermiculite sterile. The evaluations were carried out daily after the fourth day of emergence focus in symptoms. For the sanity test the *Arpergillus* and *Penicillium* genus were detected in two storage seed batches. There was the major diversity of fungi genus on seeds storage for two months, with occurrence of *Fusarium*, *Pestalotiopsis* and *Curvularia* genus. In the patogenicity test it wasn't observed any fungi able to infect the seedlings. For colonization test it was observed in plants with provenance from seeds storage for two months major diversity of fungi genus as, *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Colletotrichum*.

Key-words: Transmition, latent colonization, sanity test.

3 INTRODUÇÃO

O teste de sanidade de sementes é a análise das mesmas para detecção e identificação dos patógenos a elas associados e tem como objetivo determinar o estado sanitário de uma amostra de sementes e conseqüentemente, do lote que representa, obtendo-se assim, informações que podem ser usadas para comparar a qualidade de diferentes lotes, bem como para determinar a sua utilização comercial (BRASIL,1996).

Sabendo-se que as informações sobre sementes florestais são bastante restritas e que o uso de mudas para diversos fins depende sobremaneira da qualidade sanitária e fisiológica dessas sementes, o presente trabalho teve por objetivo conhecer a micobiota associada às sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.); verificar se essa micobiota é capaz de ser transmitida pelas sementes e verificar se os gêneros fúngicos conseguem sobreviver nos tecidos vivos das plântulas sem causar sintomas, apenas esperando uma oportunidade de se manifestar, caracterizando o processo de colonização latente.

A leucena é uma espécie que tem uma ampla distribuição no Estado de Sergipe e possui um alto potencial de utilização, especialmente em pequenas propriedades rurais graças ao seu rápido crescimento e aos usos múltiplos como forragem, lenha, celulose, madeira e fertilizante.

Na Região Semi-Árida do Nordeste brasileiro, onde existem limitações para a agricultura dependente de chuva, o desenvolvimento e o manejo dessa espécie vão ao encontro dos interesses do setor agrícola, no qual os benefícios oferecidos são maiores que os riscos de se tornar invasora, contribuindo significativamente para o aumento da produção de lenha e forragem para os animais (KIILL e MENEZES, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área

Os experimentos foram conduzidos na Clínica Fitossanitária da Universidade Federal de Sergipe no período de abril a novembro de 2005. As sementes foram coletadas de duas populações, localizadas na Reserva Florestal IBURA e no *Campus* da Universidade Federal de Sergipe, em diferentes épocas, permanecendo armazenadas em câmara fria a 11°C e a 40% de umidade, embaladas em sacos de papel, até a sua utilização. Desta forma, três lotes de sementes foram utilizados, a saber: 2 meses de armazenamento (sementes coletadas em outubro de 2005 no *Campus* da UFS), 28 meses de armazenamento (coletadas em agosto de

2003 na Reserva Florestal Ibura) e 48 meses de armazenamento (coletadas em dezembro de 2001 na Reserva Florestal Ibura).

4.2 Levantamento da micobiota associada às sementes de leucena.

Para o levantamento da micobiota associada às sementes de leucena, utilizou-se o teste de sanidade com papel de filtro (DHINGRA e SINCLAIR, 1995). Duas amostras de cada lote foram utilizadas. Cada amostra foi composta por 200 sementes. A primeira foi desinfestada com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% durante 3 minutos, sendo em seguida lavada duas vezes em água destilada esterilizada. As sementes foram distribuídas em 10 caixas plásticas transparentes tipo gerbox, previamente desinfestadas com solução de álcool a 70%, forradas com 3 folhas de papel filtro esterilizadas e pré-umidecidas com água estéril contendo 200 ppm de tetramicina. Cada caixa contendo 20 sementes. A outra amostra não foi desinfestada, sendo apenas imersa em água destilada esterilizada por 3 minutos, em seguida lavada duas vezes em água destilada esterilizada e distribuída nas caixas gerbox, como na primeira amostra. As sementes foram plaqueadas em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação do ambiente.

Após oito dias de incubação à temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), sob o fotoperíodo de 12 horas, as sementes foram observadas individualmente ao microscópio estereoscópico. O exame morfológico dos fungos foi feito ao microscópio de luz, quando necessário, para a observação de detalhes morfológicos, comparando-os com informações disponíveis na literatura (BARNETT e HUNTER, 1986; ELLIS, 1971; SUTTON, 1980).

4.3 Transmissão dos fungos associados às sementes

Duzentas sementes de cada lote foram semeadas em caixas de plástico (10 x 30 x 60 cm), contendo vermiculita esterilizada. Após a semeadura, as caixas foram colocadas em bancadas à temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e irrigadas regularmente até a avaliação. Para avaliar a transmissão dos fungos pelas sementes, as plântulas foram observadas diariamente, por um período de trinta dias a partir do quarto dia de emergência. As plântulas que apresentaram sintomas foram isoladas em placas de Petri contendo BSA (batata-sacarose-ágar) para a identificação do agente causal do sintoma.

4.4 Colonização quiescente de fungos em plântulas de leucena

As plântulas que não apresentaram sintomas no teste de transmissão, após quarenta dias de germinação das sementes foram avaliadas pela técnica do paraquat (CERKAUSKAS e SINCLAIR, 1980) modificada para a verificação quanto à colonização latente por fungos capazes de permanecer no tecido vivo sem causar danos, apenas se a situação for oportuna. Para tanto, as plântulas foram retiradas da vermiculita e lavadas com água corrente para a eliminação dos resíduos. Em seguida, seções de $\pm 0,5$ cm de comprimento foram retirados dos caules e tratadas com hipoclorito de sódio a 1% durante 1 minuto e lavadas com água destilada esterilizada. As seções foram tratadas com solução de paraquat 1:40 (1mL de paraquat em 40mL de água destilada esterilizada) por 1 minuto e colocadas em placas de Petri contendo meio BSA + 50 mg/L de rosa bengala + 200 ppm de tetramicina e incubadas por 10 dias à temperatura ambiente sob fotoperíodo de 12 horas para a verificação quanto à colonização latente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Levantamento da micobiota associada às sementes de leucena.

De acordo com os resultados obtidos no teste de sanidade nos diferentes lotes de sementes, verificou-se que os gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicilium* foram detectados em todos os lotes testados, porém em porcentagens diferentes (Tabela 2.1). O lote armazenado por 28 meses apresentou a menor porcentagem de *Aspergillus niger* tanto nas sementes com desinfestação (1%) como nas sementes sem desinfestação (5%). Isso pode ter ocorrido porque as sementes testadas pertenciam a populações diferentes, que exibem comportamentos peculiares; além disso, a qualidade sanitária destas pode ser modificada de acordo com as condições ambientais na ocasião da colheita. Estes gêneros fúngicos estão associados à deterioração de sementes e já foram relatados em associação com outras espécies florestais (MARTHINS, 1991; MEDEIROS *et. al*, 1996).

Aspergillus niger foi encontrado em maior porcentagem (23,5%) nas sementes armazenadas por 48 meses sem desinfestação, e em menor porcentagem (1%) nas sementes armazenadas por 28 e 48 meses com desinfestação.

TABELA 2.1. Frequência (%) de fungos detectados no teste de sanidade das sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) armazenadas por 2, 28 e 48 meses. UFS, São Cristóvão – SE, 2005.

Fungos	Tempo de armazenamento					
	2 meses (UFS)		28 meses (Ibura)		48 meses (Ibura)	
	Com desinfestação	Sem desinfestação	Com desinfestação	Sem desinfestação	Com desinfestação	Sem desinfestação
<i>Aspergillus niger</i>	12,5*	20,0	1,0	5,0	1,0	23,5
<i>Penicillium</i> sp.	5,0	10,0	1,0	26,0	3,5	12,5
<i>Fusarium</i> sp.	8,5	6,5	-	-	-	-
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	1,0	-	-	-	-
<i>Curvularia</i> sp.	-	2,0	-	-	-	-

*Porcentagem de 200 sementes analisadas pelo teste de papel de filtro para cada tratamento.

Para todos os lotes testados, pode-se observar que houve uma diminuição na porcentagem de *Aspergillus niger* (variação de 1 a 23,5%) nas sementes que passaram pela desinfestação superficial. Pode-se inferir que este método de desinfestação foi suficiente para reduzir a incidência desse fungo, que provavelmente se encontrava em maior proporção superficialmente em tecido tegumentar.

A maior e a menor porcentagem de *Penicillium* sp. foram detectadas em sementes armazenadas por 28 meses (26 e 1%). Provavelmente esta ocorrência se deu devido ao fato de que estas sementes apresentaram os maiores valores de umidade, proporcionando um ambiente favorável à permanência deste gênero no tecido tegumentar das mesmas.

De acordo com os resultados obtidos por FAIAD *et al.* (1995), os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp tiveram uma ocorrência de 100% em sementes de *Spondias tuberosas* não tratadas, sem apresentar sintomas de podridão. Segundo os autores, a presença desses fungos contribuiu para o decréscimo do poder germinativo dessas sementes, já que as tratadas com fungicidas tiveram maiores porcentagens de germinação. Eles afirmam ainda que a contaminação de sementes por fungos saprófitas e de armazenamento ficou bastante evidenciada porque houve uma redistribuição dos fungos entre as sementes durante o período em que estiveram secando sob condições de temperatura e de umidade favoráveis.

Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicilium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* são encontrados usualmente em sementes florestais, transportados diretamente do local de colheita para o laboratório (PIÑA-RODRIGUES e VIEIRA, 1988). Gêneros como *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus* estão associados à deterioração das sementes e sua ação é dependente das condições físicas e fisiológicas das mesmas, por ocasião do início da armazenagem, e dos fatores ambientais predominantes no decorrer desse período (FILHO *et al.*, 2004).

Dentre os gêneros potencialmente patogênicos, principalmente para espécies florestais, *Fusarium*, *Pestalotiopsis* e *Curvularia* foram detectados apenas no lote de sementes armazenado por 2 meses.

Os gêneros *Curvularia* e *Fusarium* afetaram as sementes de coníferas e de outras espécies florestais no período da germinação, destruindo-as (tombamento de pré-emergência) ou destruindo as sementes recém emergidas (tombamento de pós-emergência). (LINK e COSTA, 1982; CARNEIRO, 1987)

A maioria dos fungos que estão presentes externa ou internamente nas sementes é da subdivisão Deuteromycotina. Os fungos detectados até então, na maioria das espécies florestais, têm sido identificados somente em nível de gênero (ANDERSON, 1986; CARNEIRO, 1990).

5.2 Transmissão e colonização quiescente dos fungos associados às sementes

Não foi detectada transmissão de nenhum gênero fúngico da semente para plântula. As plântulas sem sintomas foram então, isoladas para a verificação da colonização latente (Tabela 2.2). As plântulas provenientes de sementes com 2 meses de armazenamento apresentaram as maiores porcentagens dos gêneros fúngicos *Penicillium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Colletotrichum* no teste de colonização latente.

Sabe-se que fungos capazes de colonizar tecidos vivos de forma latente permanecem à espera de oportunidade para manifestar sintomas nas plantas.

TABELA 2.2. Frequência (%) de gêneros fúngicos encontrados no teste de colonização quiescente nas sementes de (*Leucaena leucocephala* Lam.) armazenadas por 2, 28 e 48 meses. UFS, São Cristóvão – SE, 2005.

Fungos	Tempo de armazenamento em meses		
	2 (UFS)	28 (IBURA)	48 (IBURA)
<i>Penicillium</i>	2,0*	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	2,0	4,0
<i>Curvularia</i>	2,0	11,0	-
<i>Fusarium</i>	22,0	2,0	-
<i>Nigrospora</i>	-	8,0	-
<i>Colletotrichum</i>	24,0	-	-

* Porcentagem de 100 sementes analisadas pelo teste de colonização latente.

Para o lote de sementes armazenadas por 48 meses a porcentagem de gêneros fúngicos encontrada foi muito menor que nos demais lotes de sementes. Isto pode ser explicado devido à longevidade dos fungos nas sementes apresentar uma diminuição à medida que o tempo de armazenamento em câmara fria aumenta.

Nas plantas dos lotes de sementes armazenadas por 2 e 28 meses observou-se a presença de *Fusarium* no teste de colonização latente (22 e 2%), sem a presença de sintomas de necroses ou lesões nas plântulas. O contrário foi observado em sementes de caupi (*Vigna unguiculata*), em que as espécies de *Fusarium* relatadas causaram inibição na germinação de algumas sementes, e mesmo as que germinaram apresentaram crescimento do fungo sobre cotilédones e folhas primárias, além de necrose na radícula (RODRIGUES, 2002).

6 CONCLUSÕES

Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Acrophialophora*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis* e *Curvularia* estão associados a sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.) de duas diferentes populações, armazenadas por 2, 28 e 48 meses.

Os gêneros *Aspergillus*, *Acrophialophora*, *Penicillium*, *Nigrospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium* colonizam tecidos vivos de plântulas de leucena.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R.L. *Check list of micro-organisms associated with tree seeds in the world*. Washington: USDA, Forest Service, (Technical Report, SE -39), 1986.
- BARNETT, H.L., HUNTER, B.B.. *Illustrated genera of imperfect fungi*. London: Mcmillan, 1986. 218p.
- BRASIL, *Regras Para Análise de Sementes*. Brasília: Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal, 1996. 445p.
- CARNEIRO, J.S. Micoflora associada à sementes de essências florestais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 11, p. 557-566. 1986.
- _____. Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paropeba-MG. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.15, n.1, p.75-7. 1990.
- CERKAUSKAS, R.F., SINCLAIR, J.B. Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues. *Phytopathology*, St. Paul, v.70, n.11, p.1036-8, 1980.
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. *Basic plant pathology methods*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434p.
- ELLIS, M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey, England: C.M.I. 1971. 608p.
- FAIAD, M.G.F., SALOMÃO, A.N., PADILHA, L.S. Levantamento de população fúngica associada às sementes de *Spondias tuberosa* Anacardiaceae e sua redução através de tratamentos fungicidas. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.21, n.3/4, p.248, 1995.
- FERREIRA, F.A. *Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa, MG: SIF, 1989. 570p.
- FILHO, R.R.R.; SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S.; FILHO, D.S.J. Fungos associados às sementes de cedro. *Summa Phytopathologica*, v. 30, n.4, 2004.
- KIILL, L. H. P.; MENEZES, E.A. (Ed.). *Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o Semi Árido Brasileiro*. EMBRAPA Semi-Árido. Brasília, DF. 2005. 340p.
- LINK, O.; COSTA, E.C. Alguns problemas fitossanitários em viveiros de essências florestais no Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 6, Curitiba, *Anais...* Curitiba, EMBRAPA, 1982.
- MACHADO, J. C. *Patologia de sementes: fundamentos e aplicações*. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106p.
- MARTINS, S. E. *Aspectos fitossanitários e fisiológicos de sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo de algumas localidades do Sul de Minas Gerais*. Lavras, MG: ESAL, 1991. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1991.

MEDEIROS, A.C.S., MENDES, M.S.S., FERREIRA, M.A.S.V., ARAGÃO, F.J.L. Avaliação Quali quantitativa de fungos associados a sementes de aroeira (*Astromium urundeuva* Fr. All). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.14, n.1, p.51-5, 1996.

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

RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de serra talhada e de caruaru, estado de Pernambuco. *Fitopatol. bras.*, Sept./Oct., vol.27, no.5, p.532-537, 2002

SUTTON, B.C. *The Coelomycetes*. England: C.M.I., 1980. 696p.
Fitopatol. bras., Sept./Oct. 2002, vol.27, no.5, p.532-537. ISSN 0100-4158.

CAPÍTULO 3

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE LEUCENA SOB DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO.

1 RESUMO

MENDES, Sandra Santos. **Qualidade fisiológica de sementes de leucena.** In: ___**Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit.): uma leguminosa de importância para os sistemas agrícolas do Nordeste.** 2005. Cap.3 Dissertação (Dissertação de mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão*.

A germinação e o vigor são os principais fatores que podem garantir a produção e manutenção de bancos de germoplasma quando se faz uso de sementes visando sua conservação *ex situ*. A avaliação correta desses fatores é imprescindível para se estimar o potencial de desempenho das sementes em campo e garantir ao produtor o estabelecimento de agroecossistemas sustentáveis. Além disso, existe carência de normas e padronizações para testes de análises de sementes de espécies florestais, o que contribui para a não certificação destas sementes. A presente pesquisa teve por objetivo verificar a qualidade fisiológica de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.) armazenadas por três períodos (2, 28 e 48 meses), procedentes da Reserva Florestal do Ibura e do *Campus* da UFS. Para isto empregaram-se testes de Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Germinação (%G), Condutividade Elétrica (CE) e Grau de Umidade (% U), para quatro diferentes tempos (0h, 24h, 48h e 96h) de envelhecimento acelerado (EA) a temperatura de 42°C e Umidade Relativa de 100%. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), no esquema fatorial 4 x 3 (tempo de envelhecimento acelerado x tempo de armazenamento), para as variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), índice de velocidade de emergência (IVE), condutividade elétrica e teor de água. No teste de isoenzimas as sementes armazenadas por 28 meses apresentaram uma maior atividade relativa para o sistema Esterase (EST), o que permite inferir um início do processo deteriorativo de membranas. Foi observado um decréscimo no IVG e IVE à medida que houve um aumento no tempo de armazenamento, sugerindo que houve perda de viabilidade e de vigor com o tempo.

Palavras-chave: vigor, germinação, isoenzimas, armazenamento

2 ABSTRACT

Germination and vigor are the mainly factors that could warranty to farmer the agroecosystems establishment and maintenance of germoplasm bank when using seeds aiming its *ex situ* conservation. The correct evaluation of these factors is important to check the potential performance of seeds on field. Besides there is a lack of regulations for forest seed testing. This fact contributes for not seed certification. The present work was carried out to verify the physiology quality in leucaena seeds (*Leucaena leucocephala* Lam.) storage for three times (2, 28 and 48 months) provenance from Ibura Park and UFS Campus. To reach this goal it was used tests as Germination Speed Index (IVG), Emergence Speed Index (IVE), Electrical Conductivity (CE), humidity (%U) and isozymes for four different Ageing Accelerate (EA) times (0h, 24h, 48h and 96h) at 42°C and 100% humidity. It was used a Randomized Statistical Design with four replications. It was observed for seeds storage for 2 months and ageing for 24 h the high values of IVG, % G e % U. In Conductivity electrical test seeds storage for 28 months presented high values and IVE, indicating the seeds viability was kept even in this period of storage. The smaller values of IVG and IVE were observed in seeds storage for 48 months. In the isozyme test the seeds storage for 28 months presented high relative activity for esterase (EST) system, which permit to infer the beginning of membranes deteriorative process without to lost their viability and vigor. It was observed and decreasing of germination values in accord with increasing of storage values suggesting a lost of viability. It could indicate the seeds of leucaena should be storage for a maximum period of 28 months without lost of their seed quality.

Key-words: vigor, germination, isozymes, storage.

3 INTRODUÇÃO

As condições ideais para a conservação de germoplasma, em longo prazo, dependem de fatores bióticos e abióticos, os quais podem afetar a germinação e vigor causando a deterioração das sementes.

A obtenção de sementes de alta qualidade representa a meta prioritária dentro do processo de produção e certificação, pois de um modo geral, a germinação e a emergência das plântulas são reflexos da qualidade fisiológica. A causa das falhas de germinação, ou mesmo da redução da velocidade de emergência, freqüentemente é atribuída ao baixo vigor associado ao processo de deterioração (ROSSETTO, 1997).

A qualidade das sementes é particularmente importante pelo alto custo de produção, que, freqüentemente envolve vultosos investimentos, cujo retorno depende, em grande parte, da qualidade das sementes utilizadas (RODO *et al.*, 2001).

Portanto, há uma necessidade da inclusão de testes em programas de controle de qualidade, que permitam, pelo menos, identificar diferenças no potencial fisiológico de lotes com alta germinação e/ou viabilidade, além de detectar possíveis diferenças no desempenho entre lotes com germinação ou viabilidade semelhantes. Nesse sentido, os testes de vigor têm se constituído em ferramentas de uso cada vez mais rotineiras (MIGUEL *et al.*, 2001).

Como as espécies se comportam diferentemente quanto às condições de armazenamento, estudos específicos para cada uma delas são necessários; neste sentido, o conhecimento da temperatura e da umidade relativa do ambiente e suas interações para fins de armazenamento são prioritários no entendimento das exigências da espécie quanto à manutenção de sua viabilidade.

A técnica de envelhecimento precoce tem utilidade como teste de vigor em sementes agrícolas e florestais (RAMOS *et al.*, 1992; BANGARWA *et al.*, 1995; TODD-BOCKARIE e DURYEA, 1993) e pode ser também utilizada como meio para avaliar a eficácia da conservação *ex situ* de espécies florestais (CHAISURISRI *et al.*, 1993), além de auxiliar no estudo de mudanças bioquímicas que acompanham os processos de deterioração (SELVA MEENA e SEN-MANDI, 1992; BASAVARAJAPPA *et al.*, 1991).

O princípio do método do envelhecimento acelerado baseia-se no fato de que lotes de sementes com alto vigor manterão sua viabilidade quando submetidos, durante curtos períodos, a condições severas de temperatura e umidade relativa em uma câmara apropriada,

enquanto as de baixo vigor terão sua viabilidade reduzida sob as mesmas condições (MARCOS FILHO *et al.*, 1987).

As alterações degenerativas que ocorrem nas estruturas internas das sementes, quando submetidas ao EA promovem um descontrole no metabolismo e nas trocas de água e de solutos entre as células e o meio exterior, determinando a queda na viabilidade das sementes (VIEIRA *et al.*, 1994).

Mudanças enzimáticas ocorrem durante a deterioração das sementes, seja por envelhecimento artificial (condições forçadas de temperatura, umidade e luz) ou natural, durante o armazenamento. Com o envelhecimento, a membrana citoplasmática sofre alterações na sua permeabilidade, e alguns componentes podem extravasar para o meio externo; além desse processo, pode ainda ocorrer desnaturação de biomoléculas e acumulação de substâncias tóxicas (BASAVARAJAPPA *et al.*, 1991).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade fisiológica de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.) colhidas de duas populações e armazenadas em três diferentes épocas, submetidas ao envelhecimento acelerado, a fim de verificar se o tempo de armazenamento influenciou na viabilidade e no vigor das mesmas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Sementes e no laboratório de Biotecnologia e Cultura de tecidos da Universidade Federal de Sergipe no período de fevereiro a dezembro de 2005.

As populações de sementes (provenientes da Universidade Federal de Sergipe – UFS e da Reserva Florestal do Ibura) foram submetidas ao teste de envelhecimento acelerado (EA). Antes, porém, a dormência das sementes foi quebrada colocando-as imersas em água durante 24 horas (FLORIANO, 2004). Para o EA, as sementes foram distribuídas em caixas plásticas tipo Gerbox, contendo uma tela de alumínio, onde abaixo desta tela 40 ml de água destilada foram colocados. As caixas foram mantidas em câmaras tipo BOD por três períodos de envelhecimento (24h, 48h, e 96h), a uma temperatura de 42°C e umidade relativa de 100%.

Após o envelhecimento e para a testemunha, as sementes foram submetidas aos testes de Porcentagem de Germinação (%G), Índice de Velocidade de Germiação (IVG), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Condutividade Elétrica (CE) e Grau de Umidade (%U). O delineamento experimental utilizado em todos os testes foi o inteiramente casualizado (DIC), no esquema fatorial 4 x 3 (tempo de envelhecimento acelerado x tempo de

armazenamento), nas variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), índice de velocidade de emergência (IVE), condutividade elétrica e teor de água. Para a normalização das variáveis, os valores de porcentagem (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG) e de emergência (IVE) foram transformados pela função *Arco-seno*. Os dados de condutividade elétrica e de teor de água (Umidade) não foram transformados. Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância seguida de regressão. As análises foram realizadas em nível α de 5% de significância. As análises descritas foram realizadas utilizando-se o programa Microsoft Excel® e o programa Sinsvar 4.3.

Índice de Velocidade de Emergência (IVE) – 200 sementes de cada matriz foram distribuídas em sulco com 1,0 m de comprimento a uma profundidade de duas vezes o tamanho da semente, sendo a distância entre os sulcos, de 10 cm. As avaliações foram realizadas do quarto ao décimo dia de acordo com (BRASIL, 1996) e as plântulas normais foram computadas para cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE). Os resultados foram expressos com segundo POPINGIS (1977):

$$IVE = \frac{E_1}{N_1} + \frac{E_2}{N_2} + \dots + \frac{E_m}{N_n}$$

onde:

E_1 , E_2 , E_m = nº de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem.

N_1 , N_2 , N_n = nº de dias de semeadura à primeira, segunda, ..., última contagem.

Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e porcentagem de germinação – Foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes cada, dispostas em caixas tipo gerbox contendo duas folhas de papel germteste, previamente autoclavadas e umidecidas com um volume de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso das folhas de papel. As caixas foram mantidas em germinador a temperatura de 25°C. As avaliações foram realizadas do quarto ao décimo dia de acordo com a Regra de Análises de Sementes – RAS (BRASIL, 1996) e as plântulas normais computadas para cálculo da porcentagem de germinação (%G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

Condutividade elétrica – para a determinação dessa variável, adotou-se a metodologia citada por VIEIRA e CARVALHO (1994). Quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento foram previamente pesadas, com precisão de centigramas e depois colocadas em copos

plásticos descartáveis (200mL) contendo 75 ml de água destilada. Em seguida os copos foram colocados em câmara de germinação tipo BOD a 25°C por um período de 24h. Após esse período, procedeu-se à leitura das soluções contendo os lixiviados das sementes com o auxílio de condutivímetro de marca Quimis Q145D previamente calibrado, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$.

Grau de umidade – Quatro repetições de 25 sementes foram utilizadas para cada período de envelhecimento acelerado (0h, 24h, 48h, 96h). As sementes foram colocadas em estufa a $105\pm 3^\circ\text{C}$, durante 24 horas e grau de umidade foi calculado com base no peso úmido (BRASIL, 1996). Os resultados foram expressos em porcentagem média de cada lote.

Extração de Isoenzimas – A extração de isoenzimas foi realizada empregando 200 mg de tecido foliar (obtidos das plântulas), 5 mg de PVP (Polivinil Pirrolidona) e 1 ml de solução tampão n.1 (Fosfato de sódio bibásico 0,034M, Sacarose 0,2M, PVP-40 2,56%, DTT-Dithiothreitol 3mM, L-Ácido ascórbico 5,7mM, DIECA 5,8mM, Bisulfito de sódio 2,6 mM, Borato de sódio 2,5mM, 2 – Mercaptoetanol 0,2%, Polietilenoglicol – 6000 1%, Água deionizada ou destilada) segundo AFENAS *et al.*, (1998). As plântulas foram maceradas manualmente mediante uso de almofariz e pistilo de porcelana previamente resfriados, adicionando-se nitrogênio líquido. Os extratos foram colocados em microtubos de 2,0 mL previamente identificados e levados à centrifuga a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Foram aplicados na canaleta do gel 30 μl de sobrenadante, para proceder à corrida eletroforética, sendo estas feitas em cuba vertical, tendo como suporte gel de poliacrilamida, em sistema descontínuo em que o gel concentrador foi de 4,5% e o gel separador de 7,5%. Para a eletroforese foi usada amperagem de 10mA por gel, tendo a corrida de duração aproximada 2 horas e 45 minutos, sendo feita á temperatura de 4°C em refrigerador. Após a corrida eletroforética, procedeu-se à revelação do gel, para o sistema enzimático Esterase (EST – 3.1.1.1) utilizando-se protocolos já estabelecidos por ALFENAS *et al.*, (1998). O gel revelado (que foi lavado em água corrente e fixado em solução de glicerol 10%) foi documentado e registrado por meio de escaners. Foi feita a análise das bandas e subunidades eletroforéticas do gel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Uso de marcadores isoenzimáticos de esterase na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de leucena.

Observou-se que para os diferentes tempos de envelhecimento acelerado das sementes ocorreram alterações na intensidade de bandas dos perfis eletroforéticos e ausência de alterações nas subunidades protéicas (Figura 3.3). Esta última afirmação permite ainda inferir que os lotes, apesar de serem de populações diferentes, não apresentaram perfis divergentes, sugerindo a não ocorrência de variação genética entre as populações para este loco em questão. Esta constatação contribui ainda para justificar as comparações realizadas no presente trabalho para dados de qualidades sanitária e fisiológica.

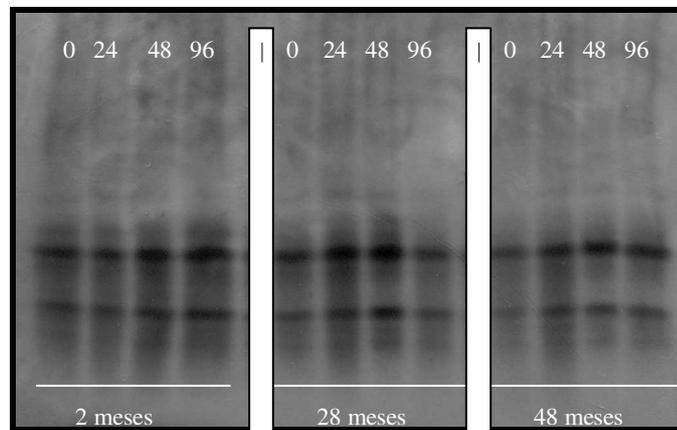


FIGURA 3.1. Perfis isoenzimáticos de esterase (EST) em géis de poliacrilamida, de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.) armazenadas por 2, 28 e 48 meses e envelhecidas por 24, 48 e 96 horas. UFS, São Cristóvão, 2005.

As sementes armazenadas por 2 meses foram as que apresentaram maior atividade enzimática identificada pela maior intensidade das bandas, quando comparadas com as de 28 e de 48 meses. Isto sugere que as sementes estavam no início do processo degenerativo de membranas, culminando na deterioração quando estas foram submetidas ao EA por 96 horas. As sementes de 48 meses de armazenamento, provavelmente apresentaram pouca atividade enzimática, devido à perda do vigor das mesmas, fato que se reflete nos baixos valores de IVE (0,26) encontrados.

Os dados obtidos das sementes de leucena concordam com os obtidos em trabalhos com sementes de eucalipto armazenadas por dois diferentes períodos, onde a atividade da esterase foi diminuída com o aumento do tempo de armazenamento para as sementes mais novas (CAMARGO *et al.*, 2000).

Avaliando-se a atividade de esterases durante a deterioração de sementes de amendoim, AUNG e MCDONALD (1995) observaram um decréscimo na atividade total destas enzimas, com o aumento de deterioração tanto em sementes embebidas como não embebidas. No entanto, com base nos perfis de bandas, observaram que essas mudanças não foram uniformes entre todas as espécies de isoesterases. Sete isoenzimas aumentaram e quatro diminuíram durante a embebição. Os autores concluíram que isoesterases específicas são suscetíveis à deterioração durante o envelhecimento de sementes de amendoim e que outras isoesterases associadas à germinação são, preferencialmente, sintetizadas durante a embebição.

Avaliando esse mesmo grupo de enzimas, alguns autores afirmam que o padrão de bandas não é uniformemente presente nos estádios de envelhecimento (BRANDÃO JÚNIOR *et al.*, 1999).

SHATTERS *et al.* (1994), trabalhando com sementes de soja, observaram uma perda de 77% da atividade de duas esterases após 48 horas de envelhecimento e um aumento da atividade total dessa enzima com o envelhecimento. CHAUHAN *et al.* (1985) verificaram em sementes de soja e cevada, que os padrões de bandas de esterase não estavam uniformemente presentes nos diferentes tratamentos referentes aos tempos de envelhecimento acelerado e que o número de bandas aumentou com o tempo de envelhecimento, sendo que algumas bandas eram específicas para determinado estágio de envelhecimento. O mesmo não foi verificado com as sementes de leucena, no entanto, observou-se uma desuniformidade em intensidade, que variou para os diferentes tempos de EA.

Os resultados obtidos pela avaliação da qualidade fisiológica das sementes, empregando testes de germinação, vigor e marcadores isoenzimáticos, podem contribuir para uma padronização do teste de envelhecimento acelerado em leucena.

Desta forma, a eletroforese de isoenzimas pode ser uma eficiente ferramenta para o acompanhamento de rotas metabólicas que contribuam para a elucidação de eventos deteriorativos que possam alterar a qualidade das sementes.

A maioria das análises de sementes sugeridas para avaliação da germinação, vigor e de processos deteriorativos durante o armazenamento tratam somente de variáveis avaliadas por meio da viabilidade e vigor. No entanto, pesquisas como as sugeridas neste capítulo, poderão contribuir cientificamente para a definição de estratégias para armazenamento de sementes pelo produtor permitindo a obtenção de material de propagação com certa flexibilidade com relação à fenologia da espécie, além de garantir formas de conservação de material propagativo, que poderá influenciar na sustentabilidade de agroecossistemas.

5.2. Análise fatorial das variáveis IVG, IVE, Condutividade Elétrica e Teor de Água (umidade) das sementes de leucena submetidas a diferentes tempos de armazenamento e de envelhecimento acelerado.

Observou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados no armazenamento de sementes de leucena. Houve interação entre os diferentes tempos de armazenamento e de envelhecimento acelerado para todas as variáveis, com exceção da Condutividade Elétrica (Tabela 3.1).

TABELA 3.1. Anova do esquema Fatorial 4 x 3 com todas as variáveis testadas.

FV	GL	Quadrados Médios			
		IVE	IVG	Condutividade	Umidade
T.A.	2	0,3459**	0,0152**	1873,1479**	555,1835*
T.E.	3	0,0009 ns	0,0056**	1354,6821**	1287,9313**
T.A. * T.E.	6	0,0014*	0,0009**	112,8061 ns	442,5697*
Erro	36	0,0006	0,0002	228,9123	157,2346
Total	47				
Média Geral		0,1690	0,0782	82,5870	15,7375
C.V.		14,11	18,24	18,32	79,68

A redução gradativa da viabilidade e do vigor observada nas sementes de leucena, promovida pelas condições estressantes do envelhecimento acelerado, sugere que suas sementes perdem a viabilidade e vigor em função do tempo de armazenamento.

A redução na germinação, à medida que se prolongou o tempo de armazenamento também foi verificada com sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg), quando testadas em diferentes substratos sob diferentes temperaturas (GARCIA e VIEIRA, 1994). Sementes de paineira perderam 26% de sua viabilidade após três anos de armazenamento, ocasionando, conseqüentemente um atraso na sua germinação (PEREZ e JARDIM, 2005).

No armazenamento em câmara fria de sementes de *Moringa oleifera*, foi verificado que o poder germinativo das sementes foi mantido por 12 meses (85%), constatando-se uma queda na qualidade aos 24 meses (71%). Nas mesmas condições testadas no ensaio, foi constatado que sementes de moringa preservam o poder germinativo inicial por nove meses (BEZERRA *et al.*, 2004), sendo reduzido após esse período.

Resultados semelhantes foram obtidos por GARCIA *et al.*, (2004), que verificaram que sementes de *Anadenanthera colubrina* Bram. apresentaram uma redução significativa da porcentagem de germinação, quando submetidas à condições de envelhecimento acelerado a 24, 48, 72 e 96h, onde a testemunha obteve 75% de germinação, enquanto que os demais tratamentos apresentaram um percentual de germinação de 32, 21, 29 e 28%.

Em sementes de eucalipto, a taxa de germinação decresceu com o aumento do tempo de armazenamento das sementes, sendo que as sementes envelhecidas artificialmente apresentaram menor vigor (54,9%), quando comparadas com os tratamentos das sementes envelhecidas naturalmente (Tukey 5%), demonstrando que o tratamento das sementes colocadas a 42°C e 100% de UR por 96 horas provocou um declínio na germinação destas (CAMARGO *et al.*, 2000).

5.3. Análise do Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) das sementes submetidas a diferentes tempos de armazenamento e de envelhecimento acelerado

Os dados de IVE e de IVG apresentaram uma tendência inversamente proporcional para germinação das sementes nos diferentes tempos de armazenamento e de envelhecimento acelerado. Observou-se ainda que as sementes que não foram submetidas ao teste de envelhecimento acelerado (0h) apresentaram valores absolutos mais elevados que as demais (Figura 3.2).

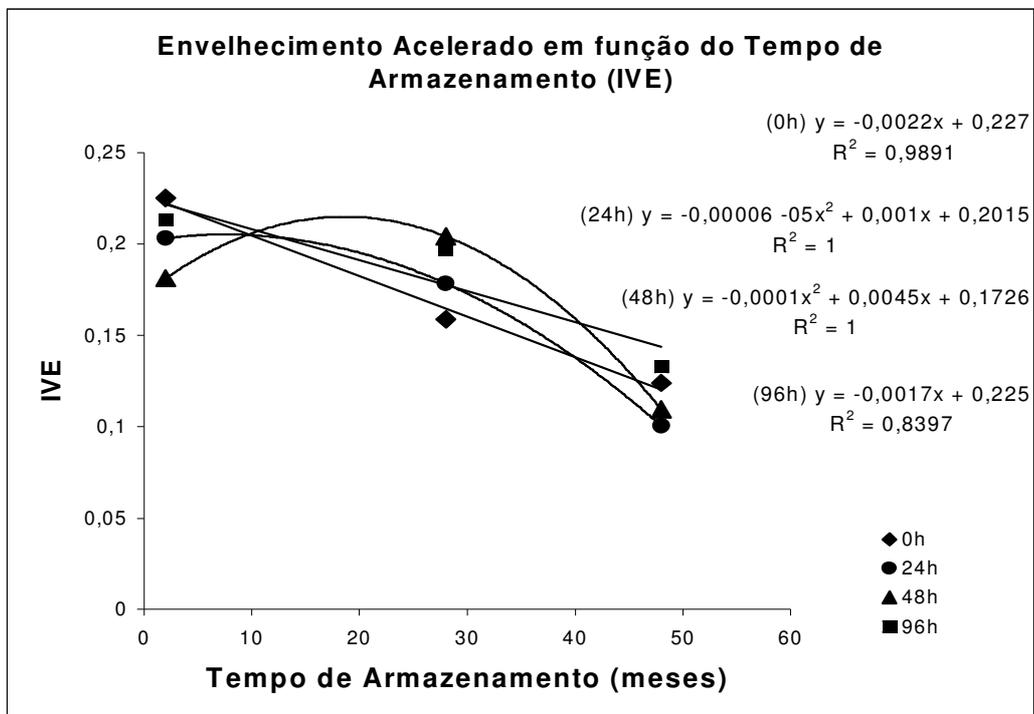


FIGURA 3.2. Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de sementes de *Leucaena leucocephala*, armazenadas e submetidas a diferentes tempos de envelhecimento acelerado. UFS, São Cristóvão, 2005.

O maior tempo de envelhecimento acelerado (96h) proporcionou os menores valores absolutos, comprovando que sementes de leucena perdem seu vigor e viabilidade de acordo com o tempo de envelhecimento (Figura 3.3).

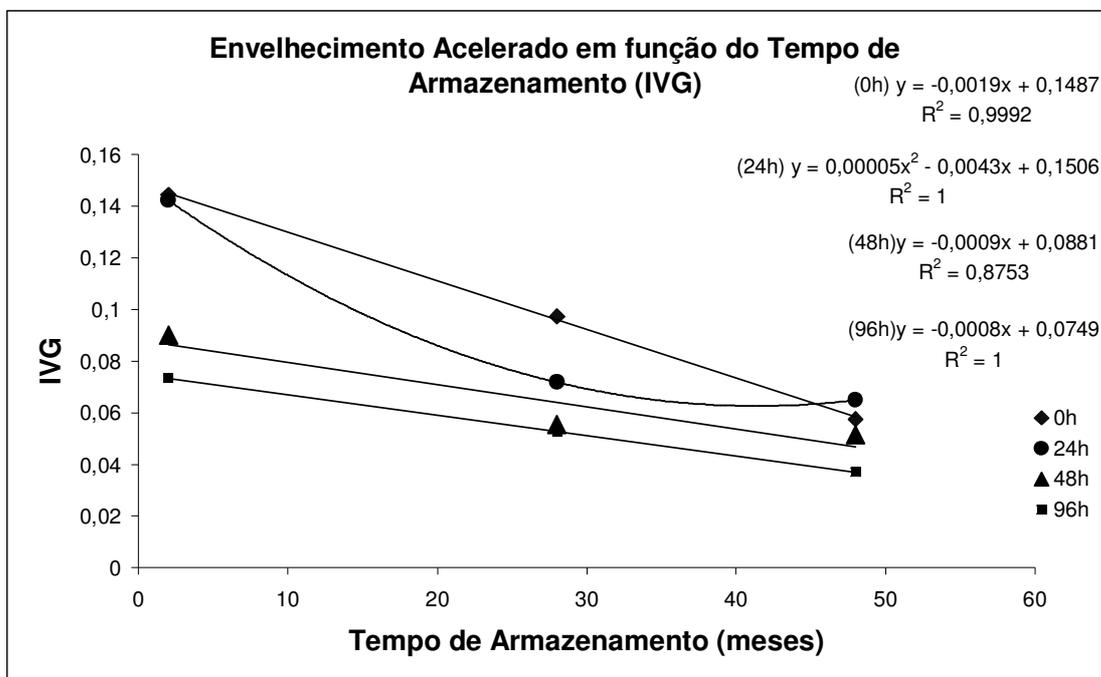


FIGURA 3.3 Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Leucaena leucocephala*, armazenadas e submetidas a diferentes tempos de envelhecimento acelerado. UFS, São Cristóvão, 2005.

Em sementes de Seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) também foi observado que o vigor avaliado pelo teste de IVG reduziu à medida que o tempo de armazenamento aumentou (GARCIA e VIEIRA, 1994), concordando com os dados obtidos no presente trabalho

Em *Araucaria augustifolia* valores de IVG foram altamente significativos em sementes envelhecidas por 3, 6 e 9 dias, com alternância da temperatura entre 30 e 40° C, indicando uma queda de vigor relacionada ao envelhecimento acelerado quando estas foram submetidas ao teste de germinação (FONTES *et al.*, 2001).

Nas condições do teste de germinação em laboratório (IVG), observou-se uma ocorrência de colônias de bactérias, que provavelmente contribuíram para reduções na viabilidade das sementes, mas que contrastaram com os resultados obtidos para o IVE (condições de campo), uma vez que os valores absolutos germinativos forma maiores quando comparados com os obtidos em laboratório. Assim, sugere-se que as condições de laboratório, como temperaturas de aproximadamente 25°C e alta umidade, não sejam restritivas ao crescimento de bactérias, enquanto que para as condições de campo, com alta incidência de

raios solares e altas temperaturas (por volta de 30°C) fazendo com que estes componentes abióticos sejam eficazes na eliminação da ação das bactérias.

5.4. Análise do teor de água e condutividade das sementes submetidas a diferentes condições de Envelhecimento Acelerado e de períodos de armazenamento.

Outro fator importante para a qualidade fisiológica diz respeito ao teor de água das sementes submetidas aos diferentes tratamentos. Observou-se que o comportamento das sementes foi muito similar em todos os tempos de envelhecimento acelerado, com exceção daquelas envelhecidas durante 96h, cuja tendência foi de um aumento até um dado ponto seguido por uma diminuição (Figura 3.4). Apenas este tempo de envelhecimento foi significativamente diferente dos demais. Desta forma, o EA não mostrou efeito negativo com relação à umidade, provavelmente funcionando como um método de quebra de dormência.

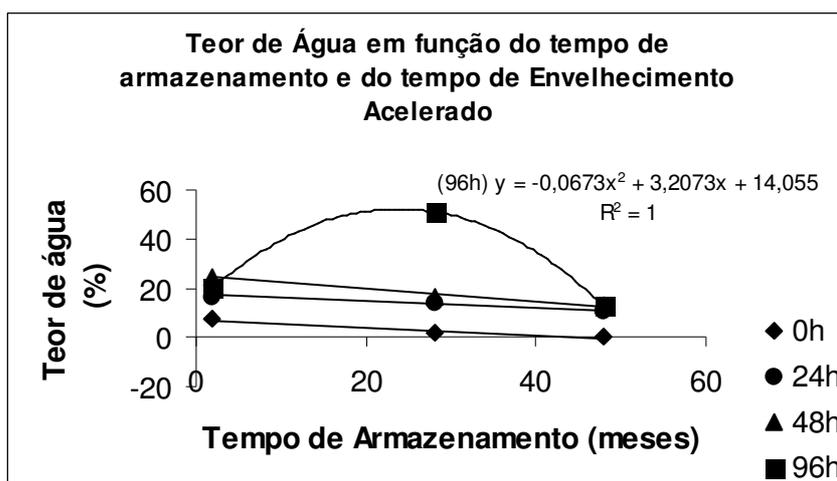


Figura 3.4. Porcentagem de teor de água de sementes de *Leucaena leucocephala* armazenadas e submetidas a diferentes tempos de envelhecimento acelerado. UFS, São Cristóvão, 2005.

O mesmo não foi verificado em sementes de *Adenantha pavonina*, onde o envelhecimento precoce não foi eficiente para superar a dormência imposta pela casca das mesmas, acarretando, porém, perda da viabilidade com o aumento da temperatura e com o tempo de permanência das sementes na câmara de envelhecimento (FANTI, 1996).

Os resultados observados permitem sugerir que com o aumento do tempo de armazenamento ocorreu uma perda na capacidade de embebição das sementes. Durante os estádios iniciais de embebição, a integridade da membrana é desestruturada por alguns minutos. Esta situação é revertida com o tempo, quando as membranas retomam a sua

configuração mais estável, através de mecanismos de reparo. Em sementes de baixo vigor ou não viáveis, tais mecanismos podem estar ausentes, ou podem ser ineficientes, acarretando a destruição da membrana (BEWLEY e BLACK,1994). Isso pode promover um ganho excessivo no teor de água contribuindo para os altos valores de umidade.

Tratamentos empregando imersão das sementes em água a 100°C durante 24 horas têm sido sugerido por FLORIANO (2004), como um método eficaz de quebra de dormência em sementes de leucena. Assim, o que pode ter ocorrido é que as condições do teste de envelhecimento acelerado agiram como um complemento à quebra de dormência realizada anteriormente ao teste.

Para o teste de Condutividade Elétrica (CE) os valores variaram de 60,17 a 102,76 $\mu\text{S/cm/g}$ e o tempo de armazenamento pode ter acarretado uma perda de água (Figura 3.5). Fato esse verificado por FOWLER (2000), que afirmou que sementes armazenadas por longos períodos perdem seu teor inicial de água, de forma excessiva, dificultando sua embebição no processo de germinação.

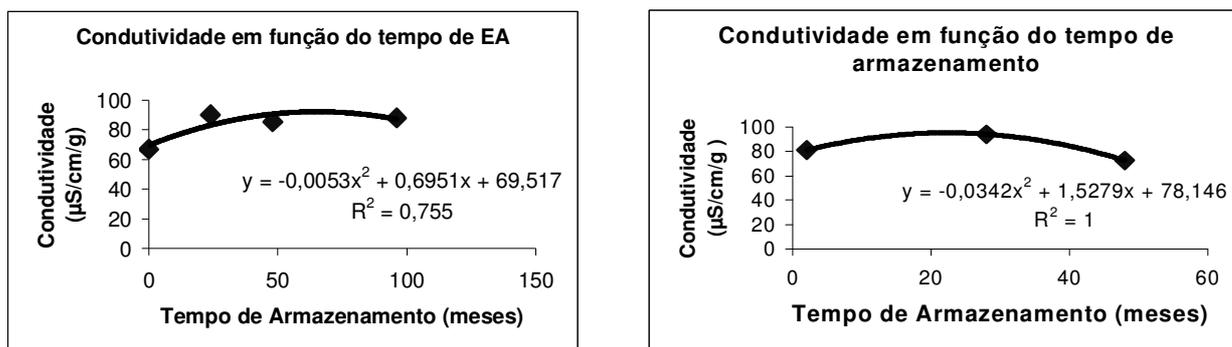


FIGURA 3.5. Condutividade elétrica de sementes de *Leucaena leucocephala*, armazenadas e submetidas a diferentes tempos de envelhecimento acelerado (a) e tempos de armazenamento (b). UFS, São Cristóvão, 2005.

O lote de sementes armazenado por 28 meses submetidos ao envelhecimento acelerado por 96 horas apresentou os maiores valores de condutividade elétrica, fato esse que justifica a baixa viabilidade encontrada no teste de IVG, bem como o alto teor de umidade encontrado nas mesmas sementes. Como se trata de populações obtidas em épocas diferentes, as condições ambientais, por ocasião da colheita, podem interferir no comportamento fisiológico das sementes.

6 CONCLUSÕES

Testes de germinação, vigor e marcadores isoenzimáticos de esterase podem contribuir para uma padronização do teste de envelhecimento acelerado em sementes de leucena;

Com o aumento do tempo de armazenamento de sementes de leucena, há uma diminuição do vigor e da viabilidade;

Não foi verificada uma variação em sub-unidades de esterase para as diferentes populações, o que permite sugerir uma similaridade genética entre as populações procedentes da Reserva Florestal Ibura e do *Campus* da Universidade Federal de Sergipe.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; PETRES, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G.C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: UFV, 1998, 242p.

AUNG, U.T.; MCDONALD, M.B. Changes in esterase activity associated with peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed deterioration. *Seed Science Technology*, Zurich, v.23, p.101-111, 1995.

BANGARWA, K.S.; SINGH, V.P.; TOMER, R.P.S. Progeny testing for seed quality parameter in *Dalbergia sisso* Roxb. *Seed Science Technology*, v. 23, p. 253-257, 1995.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Sci. & Technol.*, v. 19, p. 279-286, 1991.

BEZERRA, A. M.E.; FILHO, S. M.; FREITAS, J. B.S.; TEOFILO, E. M. Avaliação da qualidade das sementes de *Moringa oleifera* lam. durante o armazenamento. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1240-1246, nov./dez., 2004.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. *Seed physiology of development and germination*. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BRANDÃO JÚNIOR., D.S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. *Revista Brasileira de Sementes*, v.21, n.1, p.114-121, 1999.

BRASIL. *Regras para análise de sementes*. Brasília: Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal, 1996. 365p.

CAMARGO, M. L. P.; MORI, E. S.; MELLO, E. J.de; ODA S.; LIMA, G. P. Atividade enzimática em plântulas de *eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 113-122

CHASURISRI, K.; EDWARDS, D.C.W.; EL-KASSABY, Y.A. Accelerated aging of Sitka Spruce seeds. *Silva e Genetica*, v. 42, n. 6, p. 303-308, 1993.

FANTI, S.C. Comportamento germinativo sob condições de estresse e influência do sombreamento artificial e adubação química na produção de mudas de *Adenanthera pavonina* L. São Carlos: UFSCar, 1996. 153p. Dissertação de Mestrado.

FLORIANO, E.P. *Armazenamento de sementes florestais*. Caderno Didático nº1, 1ª edição. Santa Rosa, 10p. 2004.

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucária angustifolia*. *Revista Ciência Agrotécnica*. Lavras, v.25, n.2. p. 346-355, mar./abr.2001.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A. *Dormência em sementes florestais*. Colombo: EMBRAPA Florestas. 2000. 27p (EMBRAPA Florestas, documentos, 40).

GARCIA, A.; VIEIRA, R.D. Germinação, armazenamento e tratamento de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 16. n.2. p. 128-133. 1994.

GARCIA, L.C; NOGUEIRA A. C.; ABREU, D. C. A. *Influência do envelhecimento acelerado no vigor de sementes de Anadenanthera colubrina (Vellozo) Brenan – Mimosaceae* Ciência Florestal, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 85-90, 2004.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M. & SILVA, W.R. *Avaliação da qualidade das sementes*, Piracicaba, FEALQ, 1987. 230p.

MIGUEL, M. H.; CARVALHO, M. V. de; BECKERT, O. P.; MARCOS FILHO, J.; Teste de frio para avaliação do potencial fisiológico de sementes de algodão. *Scientia Agrícola*, v.58, n.4, p.741-746, 2001.

PEREZ, S.C.J.G.de A.; JARDIM, M.M. viabilidade e vigor de sementes de paineira após armazenamento, condicionamento osmótico e estresses salino e térmico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 40. n. 6, p.587-593, 2005.

POPINGIS, F. *Fisiologia de sementes*. Brasília: Agriplan, 1977. 285p.

RAMOS, A.; BIANCHETTI, A.; MARTINS, E.G. Viabilidade de lotes de sementes de bracatingacomum (*Mimosa scabrella* Benth) e de bracatinga-argentina (*Mimosa scabrella* var. *aspericarpa*) após teste de envelhecimento precoce. *Boletim de Pesquisa Florestal.*, v. 24/25, p. 79-82, 1992.

RODO, A. B.; PERLEBERG, C. S.; TORRES, S. B.; GENTIL, D. F. de O. & TESSARIOLI NETO, J.; Qualidade fisiológica e tamanho de sementes de cenoura. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.58, n.1, p.201-204, jan./mar. 2001.

ROSSETTO, C.A.V; NOVEMBRE, A.D. da L.C; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R. da & NAKAGAWA, J.; Efeito da disponibilidade hídrica do substrato, da qualidade fisiológica e do teor de água inicial das sementes de soja no processo de germinação. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.54, n. 1-2, p.97-105, Jan./Ago. 1997.

SHATTERS JR., R.G., ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O. WEST,S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Science Research*, v.4, p.33-41, 1994.

SELVA MEENA R., A.; SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. *Seed Scientia & Technology.*, v. 20, p. 215-222, 1992.

TODD-BOCKARIE, A.H.; DURYEA, M.L. Seed pretreatment methods to improve germination of the multipurpose west African forest species *Dialium guineense*. *Forest Ecology and Management.*, v. 57, p. 257-273, 1993.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M.; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). *Teste de vigor em sementes*. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.31-47.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas semelhantes às conduzidas nesta dissertação nunca foram realizadas com microrganismos associados às sementes de *Leucaena leucocephala* em populações no Estado de Sergipe. Este fato desperta novas necessidades para a obtenção de informações que possam auxiliar pesquisadores e produtores na tomada de decisões, visando a utilização de sementes de leucena como fonte de proteína para alimentação animal, bem como vegetação para suprimir a exploração intensa de plantas nativas, que têm sido usadas indiscriminadamente em várias regiões do Estado de Sergipe. Este uso tem gerado remanescentes de espécies florestais nativas, cada vez mais antropizados e de difícil recuperação.

A demanda crescente por novas práticas agrícolas, visando a sustentabilidade dos agroecossistemas, vem de encontro a esta nova perspectiva, com a redução da utilização irracional de recursos naturais e busca de plantios que contribuam para a demanda de alimento e vegetação capaz de melhorar as condições ambientais. Para isso, o trabalho conjunto de fitopatologistas, tecnologistas de sementes e produtores é fundamental. Neste sentido, faz-se necessário o conhecimento cada vez maior de informações sobre as interações entre patógeno e hospedeiro, que neste caso, trata-se de propágulos na forma de semente de utilização freqüente em pequenas propriedades rurais. Parte desse empenho tem sido obtido com trabalhos pesquisando a transmissão de microrganismos por sementes, patogenicidade e qualidade fisiológica das sementes florestais como sabiá, pinus, ipê-roxo, aroeira da praia, eucalipto, dentre outras (GIBSON, 1957; LASCA *et al.*, 1971; MARTINS, 1991; MENDES *et al.*, 2005).

No entanto, algumas das espécies anteriormente citadas apresentam ciclo longo e adaptação restrita a determinadas regiões. Alternativa para solucionar parte destes problemas pode ser através do cultivo da leucena, espécie introduzida e que tem se mostrado altamente adaptada às condições do Semi-árido nordestino (KILL e MENEZES, 2005).

Muita informação já tem sido publicada sobre essa espécie, no entanto, a necessidade de continuidade dessa investigação é cada vez mais crescente. Nesta dissertação, foram realizados dois trabalhos de pesquisa. No primeiro capítulo foi relatado o referencial teórico, tendo como foco aspectos relacionados à utilização da leucena na sustentabilidade de agroecossistemas, transmissão de patógenos por sementes e qualidade fisiológica de sementes armazenadas.

No segundo capítulo foram relatados os fungos que ocorrem em associação com sementes de leucena, tendo como foco a transmissibilidade e a capacidade que esses

microrganismos possuem de colonizar tecidos vivos das plântulas. Com isso, objetivou-se respaldar pesquisas específicas de manejo e formas de controle de doenças veiculadas e transmitidas por patógenos associados às sementes de espécies florestais. A dinâmica da investigação de microrganismos tem crescido, e isso sugere a continuidade de pesquisas nesta área, identificando patógenos que podem ser transmitidos por sementes e comprometer os plantios no campo. Isso poderá refletir diretamente na sustentabilidade agrícola e econômica para o produtor.

No terceiro capítulo, a qualidade fisiológica das sementes de leucena foi verificada empregando-se métodos de envelhecimento acelerado, com o objetivo de observar qual é o melhor tempo de armazenamento capaz de manter a viabilidade e vigor das mesmas, visando a promoção da manutenção e conservação de propágulos desta espécie, que poderão ser utilizadas de acordo com as necessidades dos produtores e da disponibilidade de condições climáticas, econômicas e ecológicas empiricamente definidas por estes, em interação com informações científicas veiculadas por extensionistas.

A combinação de testes-padrão como germinação e testes suplementares, como os testes de condutividade elétrica e avaliação da qualidade fisiológica das sementes por marcadores bioquímicos, vêm auxiliar na definição de variáveis que possam contribuir para a identificação de gargalos no armazenamento de sementes, culminando na deterioração e comprometendo a qualidade do material de propágulo usado pelo produtor.

Esta pesquisa, além de contribuir para aspectos relacionados à qualidade sanitária e fisiológica de sementes de leucena, abre perspectivas futuras para novos estudos visando a continuidade desses trabalhos de mais diversa natureza. Desde a avaliação da influência das condições dessas associações para cultivos em campo, são aspectos que se refletem economicamente na sustentabilidade da atividade agrícola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GIBSON, I.A.S. Saprophytic fungi as destroyers of germinating pine seeds. *East African Agricultural Journal*, Nairobi, 203-6. 1957.

KIILL, L. H. P.; MENEZES, E.A. (Ed.). *Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o Semi Árido Brasileiro*. EMBRAPA Semi-Árido. Brasília, DF. 2005. 340p.

LASCA, C.C., SAMPAIO, A.S., CINTRA, A.F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. *O Biológico*, São Paulo, v.37, n.11, p.287-96, 1971.

MARTINS, S. E. *Aspectos fitossanitários e fisiológicos de sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo de algumas localidades do Sul de Minas Gerais*. Lavras, MG: ESAL, 1991. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1991.

MENDES, S. S.; SANTOS, P. R. dos; SANTANA, G. C.; RIBEIRO, G.T.; MESQUITA, J.B. Levantamento, patogenicidade e transmissão de fungos associados às sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). *Revista Ciência Agronômica*, vol. 36, nº 1, jan-abr., 2005:118-122.