

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM  
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, AGRICULTURA E AMBIENTE –IEAA  
CURSO DE AGRONOMIA

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS  
ASSOCIADOS ÀS SEMENTES PROVENIENTES DE  
COMUNIDADES PERTENCENTES AO MUNICÍPIO DE  
HUMAITÁ-AM.**

Humaitá- AM  
Setembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM  
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, AGRICULTURA E AMBIENTE -IEAA  
CURSO DE AGRONOMIA

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS  
ASSOCIADOS ÀS SEMENTES PROVENIENTES DE  
COMUNIDADES PERTENCENTES AO MUNICÍPIO DE  
HUMAITÁ-AM.**

**Aluna: Maria Clécia Gomes Sales**  
**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Verônica Silva do Nascimento**

“Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao colegiado de Agronomia  
do Instituto de Educação Agricultura e  
Ambiente, como parte dos requisitos  
básicos para obtenção do título de  
Engenheiro Agrônomo”.

Humaitá-AM

Setembro de 2013

S163i

Sales, Maria Clécia Gomes.

Incidência de fungos fitopatogênicos associados às sementes provenientes de comunidades pertencentes ao município de Humaitá-AM / Maria Clécia Gomes Sales.-- 2013.

40 f. ; il.

Monografia (Engenheiro Agrônomo) – Universidade Federal do Amazonas, curso de Agronomia, Humaitá, 2013.

Orientador: Prof. Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento.

1. Fungos. 2. Sementes. 3. Comunidades. I. Ana Verônica Silva do Nascimento. II. Título.

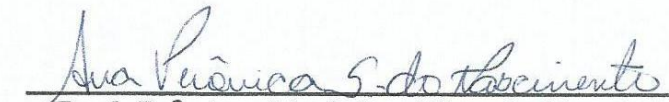
CDU: 631.5.582.28(811.3)(043.3)

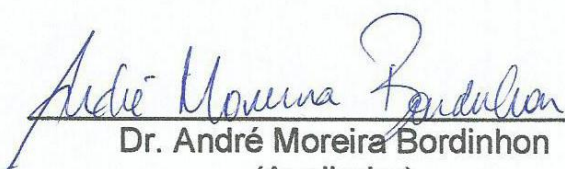
**Universidade Federal do Amazonas – UFAM  
Campus Vale do Rio Madeira – CVRM  
Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente – IEAA  
Coordenação do Curso de Agronomia**

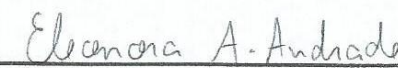
**INCIDÊNCIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS ÀS  
SEMENTES PROVENIENTES DE COMUNIDADES PERTENCENTES AO  
MUNICÍPIO DE HUMAITÁ-AM.**

**Maria Clécia Gomes Sales**

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em:  
13/09/2013, com a banca examinadora composta pelos seguintes  
professores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Verônica Silva do Nascimento  
(Orientadora/Avaliadora)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. André Moreira Bordinhon  
(Avaliador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Eleonora Alvarenga de Andrade  
(Avaliador)

“Se não houver frutos  
Valeu pela beleza das flores.  
Se não houver flores  
Valeu pela sombra das folhas.  
Se não houver folhas  
Valeu pela intenção da semente...  
(Henfil)

**EPIGRAFE**

Aos meus amados pais Manoel Sales e Maria Luzia, que durante toda minha vida cuidaram de mim, contribuindo para a pessoa que hoje sou.

A minha avó Rita Sales (*in memoriam*) pelos ensinamentos e valores passados. Saudades eternas.

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo à Deus, pai misericordioso que sempre está ao meu lado e que me deu saúde e sabedoria para concluir uma importante etapa da minha vida.

Aos meus pais Manoel José Reis de Sales e Maria Luzia Pereira Gomes de Sales, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão, oportunidades, paciência, enfim, meus pais sem dúvida nenhuma são merecedores e grandes responsáveis por essa vitória, amo vocês.

Aos meus irmãos Cleber, Mateus, Katsurayama e em especial Katiele, que sempre me deram apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. E ao meu sobrinho Guilherme, pelo simples fato de existir e sorrir pra mim.

Agradeço meu namorado Hugo Barbosa, por ter vivenciado comigo, passo a passo, cada etapa deste trabalho, me dado apoio em todos os momentos, me passando tranquilidade e torcendo por mim, muito obrigado amor.

À professora Dr<sup>a</sup> Ana Verôncia Silva do Nascimento, pelo privilégio de sua orientação, por ampliar meus conhecimentos com paciência e respeito, pelas oportunidades e pelas suas correções e incentivos.

Às minhas amigas Ediana Pereira e Michele de Paula, pela amizade, e dedicação em todos os momentos.

Ao professor Douglas Pinheiro, pelo apoio oferecido no decorrer do curso e dedicação nas disciplinas.

Aos colegas, professores e amigos do Curso Agronomia pela alegria dos bons momentos e apoio nos maus, pela amizade, companheirismo e parceria, troca de experiência e conhecimento.

Aos colegas do Laboratório de Fitossanidade, do Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Valmir Abadia, Geovana Tenório, Maria Francisca, Rozenir de Carvalho, Gisely Melo, em especial Hugo Barbosa, Naíme Andreotti, Júlio Menhardt e, obrigada pela ajuda nos trabalhos, pelos conhecimentos divididos e pela amizade acima de tudo.

Ao Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente- IEAA, pela qual tenho muito orgulho e gratidão, pela oportunidade de me qualificar profissionalmente.

Aos produtores rurais das comunidades estudadas. Nada seria sem vocês. Com certeza sempre terei carinho, respeito e agradecimento. Obrigada por tudo.

À todos que direta ou indiretamente tenha contribuído em qualquer aspecto para a execução deste trabalho.



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>TABELA 1.</b> Espécies fúngicas associadas a sementes de várias culturas .....  | 5  |
| <b>TABELA 2.</b> Identificação das sementes analisadas .....   | 15 |
| <b>TABELA 3.</b> Componentes do meio de cultura do meio Batata Dextrose Ágar (BDA).....  | 17 |
| <b>TABELA 4.</b> Análise de variância das comunidades e meios de cultura referentes a incidencia de fungos fitopatogênicos .....             | 29 |
| <b>TABELA 5.</b> Resultado da análise de variância das comunidades e meios de cultura referentes a incidencia de fungos fitopatogênicos..... | 30 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 1.</b> Aspectos Morfológicos de <i>Aspergillus Flavus</i> . A- Crescimento do fungo na superfície de um grão de sorgo; B- detalhe de uma parte da colônia visão pelo microscópio óptico; C- conídios; D- Conidióforo jovem e maduro de cor hialina. .... | 8  |
| <b>FIGURA 2.</b> Aspectos morfológicos de <i>Penicillium</i> sp. A- Micélio superficial em laranja; Conidióforos e células fialídias; C- Estrutura do fungo em forma de vassoura com ramificações; D- Conídios e conidióforos.....                                 | 10 |
| <b>FIGURA 3.</b> Aspectos morfológicos de <i>Fusarium</i> sp; A- <i>Fusarium</i> sp, B- Conídios; C- Célula conidiogênica; D- Clamidosporo; E- Esporodoquio.....   | 12 |
| <b>FIGURA 4.</b> Localização da área de estudo .....   | 14 |
| <b>FIGURA 5.</b> Isolamento do fungo em papel filtro. 3A- Placa de Petri com papel filtro esterelizado e umedecido; 3B- Plaqueamento de sementes de milho pelo método do papel filtro .....  | 16 |
| <b>FIGURA 6.</b> Isolamento das sementes em meio de cultura BDA. 4A- Plaqueamento em meio de cultura BDA; 4B- encubação dos fungos em BOD.   | 18 |
| <b>FIGURA 7.</b> Repicagem dos fungos para tubos de ensaio. 5A- Repicagem do material isolado; 5B- Crescimento fúngico em tubos de ensaio .....  | 19 |
| <b>FIGURA 8.</b> Confecção das lâminas para identificação dos fungos. 6A- Preparo das lâminas; 6B- Lâminas com corante sefranina .....   | 19 |
| <b>FIGURA 9.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de milho na comunidade Paraizinho, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro. ....                                       | 21 |
| <b>FIGURA 10.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de açaí na comunidade Paraizinho, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro. ....                                       | 23 |
| <b>FIGURA 11.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de urucum na comunidade Paraizinho, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro.....                                      | 24 |
| <b>FIGURA 12.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de cacau na comunidade Paraíso Grande, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro. ....                                  | 25 |

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 13.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de açaí na comunidade Paraíso Grande, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro .....     | 26 |
| <b>FIGURA 14.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de melancia na comunidade Paraíso Grande, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro ..... | 26 |
| <b>FIGURA 15.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de café na comunidade Alto Crato, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro .....         | 27 |
| <b>FIGURA 16.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de açaí na comunidade Alto Crato, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro .....         | 28 |
| <b>FIGURA 17.</b> Porcentagem de incidência de <i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium</i> sp em sementes armazenadas de ingá na comunidade Alto Crato, em meio de cultura BDA, Ágar e Papel Filtro .....         | 29 |

# INCIDÊNCIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES PROVENIENTES DE COMUNIDADES PERTENCENTES AO MUNICÍPIO DE HUMAITÁ-AM.

## RESUMO

Devido à falta de informações sobre os riscos de utilizar sementes contaminadas por fitopatógenos, a maioria dos pequenos produtores utilizam sementes da safra anterior ou até mesmo cedida por outros produtores, aumentando dessa forma a disseminação de fitopatógenos por sementes. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo detectar fungos fitopatogênicos associados às sementes coletadas em três comunidades agrícolas no município de Humaitá, AM, com a finalidade de obter informações para o estabelecimento de futuras estratégias de controle de doenças nas áreas de produção. Inicialmente, foram realizados levantamentos em comunidades agrícolas pertencentes ao município de Humaitá, AM, objetivando identificar as culturas propagadas por sementes. As sementes identificadas foram coletadas e enviadas para o laboratório de Fitossanidade (UFAM/IEAA) para realização do experimento. Para a detecção de fungos nas sementes foram utilizados três métodos de isolamento: o método de papel filtro e os métodos de plaqueamento em meios de cultivo sólido de ágar e BDA, sendo dispostas quatro sementes em cada placa de Petri/método. A identificação dos fungos foi feita pela confecção de lâminas, utilizando corante Safranina e observação das estruturas fúngicas em microscópio óptico comparando com as características descritas em literatura específica. Os resultados indicam um maior crescimento patogênico dos fitopatogénos em meio de cultivo BDA, seguido do meio de cultivo Agar. Foram detectados a presença dos fungos *Aspergillus* sp, *Penicilium* sp nas sementes de milho, açaí, cacau, café, e ingá nas comunidades coletadas. Sementes de urucum e melancia, coletadas na comunidade Paraizinho e Paraíso Grande respectivamente, apresentaram presença de *Aspergillus* sp. O Fungo *Fusarium* sp foi detectado na semente de urucum e açaí, coletada na comunidade Paraizinho e Paraíso Grande respectivamente.

**Palavras-Chave:** Detecção de fungos, Papel Filtro, BDA, Ágar.

# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 1  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 3  |
| 2.1. Patologia de sementes .....   | 3  |
| 2.2. Fungos associados a sementes .....  | 4  |
| 2.2.1. Gênero <i>Aspergillus</i> sp. ....  | 7  |
| 2.2.2. Gênero <i>Penicillium</i> sp. ....  | 9  |
| 2.2.3. Gênero <i>Fusarium</i> sp. ....   | 11 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | 13 |
| 3.1. Geral .....   | 13 |
| 3.2. Específicos.....  | 13 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 14 |
| 4.1. Área de estudo.....   | 14 |
| 4.2. Local de condução do experimento, levantamento das principais culturas e coleta das sementes.....                 | 15 |
| 4.3. Isolamento do material coletado .....   | 15 |
| 4.3.1. Quantificação fúngica das sementes .....  | 15 |
| 4.3.2. Isolamento do fungo pelo método do papel filtro .....   | 16 |
| 4.3.3 Isolamento do fungo pelo método de plaqueamento em meio de cultura sólido Batata Dextrose Ágar (BDA) e Ágar..... | 17 |
| 4.3.4. Repicagem para tubos de ensaio com o meio de cultura BDA .....  | 18 |
| 4.3.5. Identificação dos fungos.....   | 19 |
| 4.3.6. Análise dos resultados .....  | 20 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 21 |
| 5.1. Caracterização e identificação dos microrganismos patogênicos encontrados nas sementes .....                      | 21 |
| 5.2. Identificação de fungos patogênicos em sementes coletadas na comunidade Paraizinho .....                          | 21 |
| 5.3. Identificação de fungos patogênicos em sementes coletadas na comunidade Paraíso Grande.....                       | 24 |
| 5.4. Identificação de fungos patogênicos em sementes coletadas na comunidade Alto Crato .....                          | 27 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....  | 31 |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>7. REFERENCIA</b> ..... | <b>32</b> |
|----------------------------|-----------|

## 1. INTRODUÇÃO

A semente é um dos insumos mais importantes na agricultura, constituindo-se em fator determinante de sucesso ou fracasso da produção, uma vez que ela contém todas as potencialidades produtivas de uma planta, e é praticamente o único insumo ao alcance do pequeno produtor (COSTA e CAMPOS, 1997). Segundo Scherer & Baudet (1990), grande parte dos agricultores tem como prática utilizar parte de sua produção de grãos para ser semeada na safra seguinte. No entanto, essas sementes estão sujeitas a uma série de fatores que podem limitar seu desenvolvimento, dentre estes a ocorrência de microrganismos (MACHADO, 2000).

A importância da associação patógeno-semente não está baseada apenas ao fato de ser mais um processo de disseminação, refere-se também a capacidade do patógeno em utilizar a semente como substrato para sua sobrevivência, implicando em consequências diretas, tais como a introdução de patógenos para áreas índenes e de novas raças mais virulentas, ainda não existentes na área, assegurando a introdução do patógeno já nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta (MENTEN, 1995)

De acordo com Araújo *et al.* (2006), além de transportar fungos, vírus e bactérias patogênicas, as sementes também podem transportar externamente, fungos saprófitas que podem reduzir seu poder germinativo, podendo dar origem a epidemias graves, se as condições climáticas forem favoráveis. Assim, a semente contaminada ou infectada é um dos meios mais eficientes de introdução e acúmulo de patógenos em áreas de cultivo (MACHADO, 1986) e um eficiente meio de sobrevivência de patógenos na natureza (AGRIOS, 2005).

A transmissão de fungos via semente pode ser dividida em dois grupos ecológicos: fungos de campo, caracterizados por invadir a semente no período de sua formação, desenvolvimento e maturação; e os fungos de armazenamento, que podem se reproduzir nos tecidos secos da semente e produzir toxinas que podem afetar a viabilidade das sementes, podendo estar no ar como contaminantes (KENNEDY, 1979; BERJAK, 1987; WETZEL, 1987).

Segundo Menten (1995), a interferência de fungos nos processos fisiológicos essenciais da semente, podem favorecer o processo de deterioração durante o armazenamento, conduzindo à perda da capacidade

germinativa até a morte das sementes, e por isso é importante a avaliação do crescimento fúngico, pois a partir dessas informações é possível entrar com medidas de manejo visando minimizar o impacto que esses fungos possam causar na produção.

Entre os métodos mais usados para a avaliação do crescimento fúngico estão os meios de cultura, os quais devem ser utilizados quando outros não ofereçam condições adequadas para crescimento vegetativo, esporulação e detecção de fungos que produzam colônias características (LUCCA FILHO, 1987). Em laboratório, os fungos de armazenamento podem ser identificados através do método do papel de filtro, pois permite número maior de repetições, não envolve trabalho de laboratório especializado, é teste relativamente simples e fornece uma ampla visão das condições fitossanitárias das sementes. Já meios de cultura agarizados, são recomendados por exercerem controle sobre a população bacteriana que possa estar nas sementes, facilitando também a identificação de fungos (NEERGAARD, 1979). A composição do meio de cultura é de fundamental importância para a identificação de fungos fitopatogênicos. Quando um fungo cresce bem em um substrato e não em outro, acredita-se que metabólitos específicos estejam envolvidos (Menezes & Silva-Hanlin, 1997).

Devido à falta de informações sobre os riscos de se utilizar sementes contaminadas por fitopatógenos, a maioria dos pequenos produtores utilizam sementes da safra anterior ou até mesmo cedida por outros produtores, aumentando dessa forma a disseminação de fitopatógenos por sementes. Diante disso, buscam-se com esse trabalho realizar um levantamento em comunidades rurais sobre a incidência de fitopatógenos presentes nas principais culturas propagadas por sementes.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Patologia de sementes

As sementes são órgãos de propagação vegetal e eficientes veículos de disseminação de fitopatógenos em campos agrícolas, os quais podem infestá-las ou infectá-las, dependendo da sua localização (MACHADO, 1994). De acordo com Ito & Tanaka (1993), a presença de certos patógenos nas sementes pode provocar a redução do potencial germinativo, do vigor, da emergência, do período de armazenamento e até do rendimento. Isso acontece devido ao fato de as sementes contribuírem com aproximadamente 90% para a propagação das culturas, dessa forma, muitos fungos, bactérias, vírus e alguns fitonematóides podem apresentar-se associados às mesmas, causando severos danos às culturas e conseqüentemente diminuindo a produção (NEERGAARD, 1979; CARNEIRO, 1990).

Mizubuti & Maffia, (2006) definem a patogenicidade como a capacidade que um organismo apresenta, quando associado ao hospedeiro, em causar a doença. Segundo Teixeira *et al.*, (1997) os patógenos podem associar-se as sementes de diferentes maneiras, contaminando-as superficialmente, ou colonizando os tecidos internos. De acordo com Menten (1996), a presença de um agente patogênico na semente não garante que esse agente irá infectar a planta. Porém indica o potencial de transmissão da associação patógeno-semente e conseqüente estabelecimento de doença por ocasião da semeadura no campo. Para Carvalho (1997), os danos causados por patógenos através das sementes são variáveis, podendo causar perdas, considerando o campo de produção restringindo seus efeitos à redução de rendimento, sem, no entanto, afetar a viabilidade das sementes. Porém outros patógenos são caracterizados por, concentrar seus efeitos danosos sobre a semente, quando colonizam seu embrião. Como conseqüência direta têm-se reduções na porcentagem de germinação e no vigor.

A transmissão de um patógeno pela semente pode ser influenciada por uma série de fatores, destacando-se os fatores relacionados à espécie cultivada, condições ambientais, práticas culturais, sobrevivência do inóculo, vigor da semente, microflora do solo e da semente (NEEGAARD, 1983; AGARWAL & SINCLAIR, 1997). Segundo Machado (1988) uma única semente,

germinada ou não, pode transportar ao mesmo tempo, várias espécies de patógenos, que podem ser disseminados para áreas livres. Dessa forma, mesmo utilizando sementes saudáveis, muitas doenças podem ocorrer no campo, por contaminação, pelos processos naturais de disseminação dos patógenos (TANAKA, 1982).

O transporte de patógenos via semente pode ocorrer de três formas: O patógeno, separado ou não, encontra-se misturado às sementes; o inóculo encontra-se aderido às sementes ou encontra-se internamente às sementes, seja nas camadas externas ou no embrião (MACHADO, 1988).

## **2.2. Fungos associados a sementes**

A maioria dos agentes etiológicos das doenças é transmitida via sementes, principalmente às causadas por fungos que podem depreciar a qualidade dos grãos, reduzir o poder germinativo e serem disseminados para novas áreas, formando focos primários de infecção e podendo ocasionar perdas irreparáveis (MACHADO, 1994). As sementes estão claramente envolvidas na continuidade do ciclo biológico dos patógenos, pois segundo Casa *et al.* (2005), a maioria dos patógenos utiliza a semente como veículo de transporte e em alguns casos, utiliza a semente como abrigo à sobrevivência. De acordo com Machado (1982), o fato de sementes permanecerem viáveis por períodos de tempo mais prolongados faz com que contaminações nela presentes encontrem, também, condições favoráveis para a sobrevivência por longo período de tempo.

Segundo Machado (1988), os fungos apresentam uma maior habilidade em penetrar diretamente nos tecidos vegetais e aí alojarem-se mais facilmente. De acordo com Neergaard (1977), dentre os vários danos no campo, provenientes da ação de fungos associados sementes, os mais comuns são podridão radicular, tombamento, manchas necróticas em folhas, caules e frutos, deformações, descoloração dos tecidos e infecções latentes. Como consequência, observa-se a redução da população de plantas, a debilitação das mesmas e o desenvolvimento de epidemias (MENTEN, 1991). Isso se deve ao fato de que durante o processo de germinação da semente o micélio do fungo que se encontra dormente no pericarpo, endosperma ou embrião, reassume as suas atividades vitais e passa a crescer do interior a superfície da

semente alcançando órgãos radiculares e aéreos (REIS & CASA, 1998). Os principais fungos de sementes encontram-se listados na Tabela 1.

**TABELA 1.** Espécies fúngicas associadas às sementes de várias culturas

| <b>Espécies Fúngicas</b>   | <b>Hospedeiras</b>   |
|--|--|
| <i>Alternaria alternata</i>  | Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)<br>Soja (Mendes <i>et al.</i> , 1998)   |
| <i>Alternaria spp.</i>   | Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)<br>Soja (Mendes <i>et al.</i> , 1998)  |
| <i>Aspergillus spp.</i>  | Amendoim (Bellettini <i>et al.</i> , 2005)<br>Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)<br>Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)<br>Soja (Mendes <i>et al.</i> , 1998)          |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i>   | Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Feijão (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Milho (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Soja (Mendes <i>et al.</i> , 1998)<br>Trigo (Mendes <i>et al.</i> , 1998)              |
| <i>Cercospora arachidicola</i><br><i>Cladosporium</i> sp.                  | Amendoim (Bellettini <i>et al.</i> , 2005)<br>Amendoim (Bellettini <i>et al.</i> , 2005)<br>Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)<br>Soja (Mendes <i>et al.</i> , 1998) |
| <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>                                       | Amendoim (Bellettini <i>et al.</i> , 2005)<br>Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)  |
| <i>Diplodiamaydis</i><br><i>Drechslera oryzae</i><br><i>Epicoccum spp.</i> | Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)<br>Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)<br>Soja (Mendes <i>et al.</i> , 1998)               |
| <i>Fusarium oxysporum</i>  | Amendoim (Bellettini <i>et al.</i> , 2005)<br>Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)  |
| <i>Fusarium spp.</i>   | Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)<br>Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)<br>Soja (Mendes <i>et al.</i> , 1998)   |
| <i>Macrophominaphaseolina</i>  | Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)<br>Soja (Mendes <i>et al.</i> , 1998)  |
| <i>Nigrospora oryzae</i><br><i>Penicillium spp.</i>                        | Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Amendoim (Bellettini <i>et al.</i> , 2005)<br>Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)   |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
|                                | Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)  |
| <i>Phaeoisariopsisgriseola</i> | Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)  |
| <i>Phomasp</i>                 | Amendoim (Bellettini <i>et al.</i> , 2005)<br>Arroz (Machado, 1988)<br>Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001) |
| <i>Pyriculariaoryzae</i>       | Arroz (Franco <i>et al.</i> , 2001)<br>Trigo (Machado, 1988)   |
| <i>Rhizoctoniasolani</i> ,     | Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)<br>Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)                                   |
| <i>Rhizopus</i> sp.            | Amendoim (Bellettini <i>et al.</i> , 2005)<br>Milho (Tanaka <i>et al.</i> , 2001)                          |
| <i>Sclerotiumrolfsii</i>       | Amendoim (Machado, 1988)<br>Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)  |
| <i>Sclerotiniasclerotiorum</i> | Feijão (Ito <i>et al.</i> , 2003)<br>Soja (Machado, 1988)  |

Fonte: (Bellettini *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2001; Machado, 1988; Mendes *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2001).

Os fungos podem associar às sementes desde o estágio de pré-fertilização até a maturação fisiológica, podendo utilizar diversos pontos de entrada para se associar às sementes. A associação de fungos via sementes pode afetar a superfície da semente e/ou aderente às estruturas envolvidas (tegumento, pericarpo, bráctea, mucilagem e outros) (MENTEN, 1986) ou ainda pode afetar o interior da semente, podendo permanecer macroscopicamente indetectável por um longo tempo, durante o qual o crescimento fúngico continua a expensas dos tecidos desse órgão, podendo levar a danos que acarretem à completa perda de viabilidade da semente (BERJAK *et al.* 1987). Fungos xerófilos ou tolerantes às condições secas por exemplo, produzem propágulos de resistência, como clamidósporos, esclerócios ou micélios dormentes, capazes de permanecer viáveis por muito tempo nas sementes.

Os fungos que atacam as sementes são divididos em dois grupos: fungos de campo e fungos de depósitos. Podem ser encontrados fungos chamados de campo se desenvolvendo-se nos depósitos. A divisão não é taxonômica, é baseada, principalmente, nos níveis de teor de umidade dos grãos, que permitem o desenvolvimento de fungos nas plantas e aqueles que se desenvolvem nas condições de armazém ou silos (LAZZARI, 1998).

As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* constituem os fungos de armazém e silos, sendo eles os principais indicadores de

deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica, conseqüentemente há redução na produção (LAZARI 1998). Espécies do gênero *Fusarium* são considerados como fungos de campo que afetam a semente, porém podem se desenvolver em armazém (PUZZI, 2000).

### **2.2.1. Gênero *Aspergillus* sp**

Características do Gênero *Aspergillus* segundo Putzke & Putzke, (1998):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

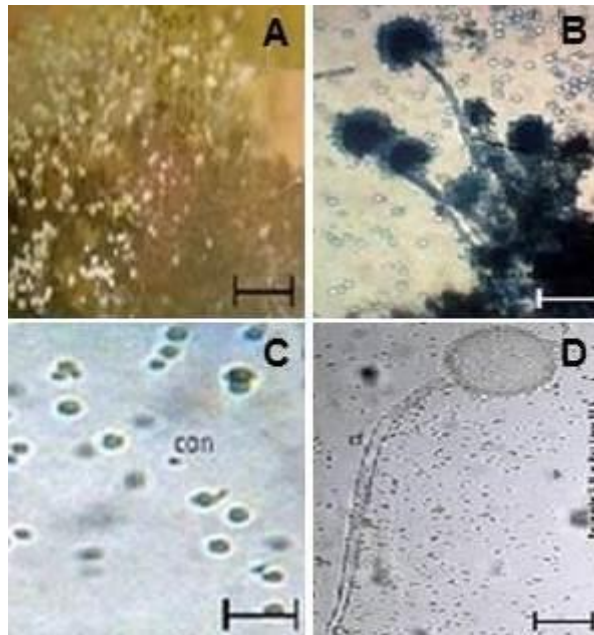
Classe: Eurotiomycetes

Ordem: Eurotiales

Família: Trichocomaceae

O gênero foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli e compreende mais de 200 espécies. Em 1926, Tom e Churh publicaram a primeira monografia sobre o gênero, as espécies pertencentes a esse gênero ficaram cada vez mais conhecidas e passou a ser um dos grandes gêneros de fungos estudados. Segundo Bennett (2010), a descrição completa do gênero foi concluída em 1965 por Rapper e Fennel, reconheceu cerca de 132 espécies e 18 variedades (Figura 1).

Os fungos são organismos filamentosos e multicelulares, com grande capacidade tóxica quando infestam grãos de alimentos. As micotoxinas são exemplos de substâncias geralmente tóxicas, heterocíclicas. São produtos do metabolismo secundário, podendo ser produzidas em pequenas quantidades pelas espécies: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamari* e *A. nomius*. Destes, *A. flavus* e *A. parasiticus* (BBIS, 2008).



**FÍGURA 1.** Aspectos Morfológicos do *Aspergillus Flavus*. A- Crescimento do fungo na superfície de um grão de sorgo; B- detalhe de uma parte da colônia visão pelo microscópio óptico; C- conídios (con); D- Conidióforo (cf) jovem e maduro de cor hialina. **FONTE:** Resende, (2010).

A reprodução é assexuada. Apresentam conidióforos eretos, simples e vesícula globosa no ápice, onde se formam fialides e sobre as quais são produzidos os conídios unicelulares, que conduzem a reprodução assexuada do gênero (SANTIN, 1991 apud SAMPSON & 2001,1991. p.31). Produzem fialides e conídio em cadeia seca. O conidióforo é simples, sem ramificação e termina na vesícula, onde ficam inseridas as fialides (CHALFOUN e BATISTA, 2003).

A principal característica macroscópica utilizada para classificação é a ampla variação nas colônias, sendo encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco (KLICH, 2002; VARGA *et al.*, 2004).

Economicamente, o gênero exerce extrema importância, pois algumas espécies são responsáveis por diversas desordens em várias plantas, são considerados patógenos oportunistas, entre os patógenos comuns encontram-se as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (VARGA *et al.*, 2004). Segundo Corbellini (2013), são considerados indicadores de deterioração em sementes, e grãos, causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica.

A presença de alguns fatores como pequenas aberturas nas superfícies das sementes causadas por algumas espécies de insetos e choques mecânicos resultados das praticas agrícolas durante a colheita, transporte e armazenamento, somados as condições de umidade e temperatura promovem uma porta de entrada e um ambiente favorável para o desenvolvimento e o crescimento do propágulo. (Portal da patologia de sementes, 2010). Exemplo disso é a podridão causada *Aspergillus flavus*, *A. glaucuse* *A. niger*, nas espigas de milho. A doença é caracterizada pelo aparecimento de um mofo de coloração variando de esverdeada e negro, de acordo com a espécie envolvida. Tempo seco, injúrias ou veranicos são condições satisfatórias para a infecção a campo. Em armazéns ou silos os grãos com umidade acima de 18% causa o aparecimento do patógeno. (Embrapa, 1997).

### **2.2.2. Gênero *Penicillium***

Classificação do gênero segundo Kimati *et al.*, (1978):

Reino: Fungi;

Filo: Ascomycota

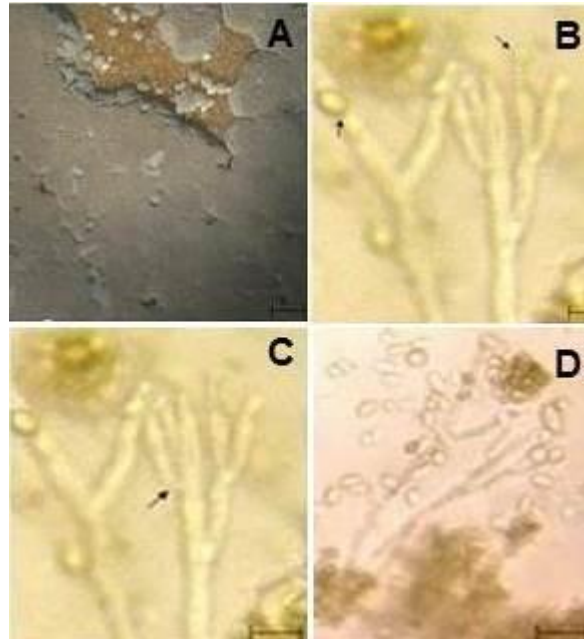
Classe: Eurotiomycetes

Ordem: Eurotiales

Família: Trichomaceae

Espécies: *Penicillium bilaiae*, *P. camemberti*, *P. candida*, *P. chrysogenum*, *P. claviforme*, *P. crustosum*, *P. funiculosum*, *P. glaucum*, *P. lacussarmientei*, *P. marneffeii*, *P. notatum*, *P. purpurogenum*, *P. roqueforti*, *P. stoloniferum*, *P. viridicatum*, *P. verrucosum*, *P. commune*.

Segundo Luz (1995), o gênero *Penicillium* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809 e assim como os gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*, estão entre os fungos de armazenamento de maior frequência no Brasil, acarretando danos relacionados à perda da viabilidade, podridão e morte de sementes (Figura 2).



**FÍGURA 2.** Aspectos morfológicos de *Penicillium* sp. A- Micélio superficial em laranja; Conidióforos e células filídias; C- Estrutura do fungo em forma de vassoura com ramificações; D- Conídios e conidióforos. **FONTE:** Oliveira, (2010).

São caracterizados por apresentarem hifas vegetativas septadas e hialinas. As ramificações férteis são mais ou menos perpendiculares a hifa e terminam em ápice na forma de vassouras com vértices nas filiáides. Os conidiósporos são eretos e ramificados próximo ao ápice (McGEE, 1988; SAMPSON & PITT, 1990).

Macroscopicamente, formam colônias com textura algodonosa baixa ou veludosa, de coloração branca, que rapidamente se transforma em tom amarelo-alaranjada, amarelo-esverdeada, verde, ou azul-esverdeada, sendo esses três últimos tons os mais frequentemente observados, apresentando crescimento rápido, com tempo de maturação por volta do terceiro ou quarto dia (ROCHA, 2004; KONEMAN *et al.*, 2008).

A reprodução desse gênero ocorre através de conídios, produzidos no ápice de conidióforos ramificados, na forma de vassoura (McGEE, 1988). A penetração ocorre através dos conídios, que são depositadas sobre os sítios de infecção, tanto na lavoura como no armazém, e ao encontrar condições de umidade e temperatura favoráveis, emitem o pró-micélio e penetram no substrato (PANTALÉON *et al.*, 1988). De acordo com Krugner *et al.*, (1995), espécies desse gênero são detectados com frequência em sementes apresentando reprodução assexuada e em condições desfavoráveis de



crescimento podem exibir sua forma teleomorfa ou sexuada, sendo então colocados na classe dos *Ascomycetes*.

Segundo Reis *et al.*, (1999), embora sejam considerados fungos de armazenamento, o gênero *Penicillium* também pode sobreviver em restos culturas, detritos de colheita e partículas de solo entre os grãos colhidos e armazenados.

### **2.2.3. Gênero *Fusarium***

A forma anamórfica de *Fusarium* sp. pertence ao Reino Fungi, Divisão *Deuteromycotina*, classe dos *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Tuberculariaceae*. O gênero é representado por 1414 espécies e 348 variedades descritas em literatura (Index Fungorum, 2010). O gênero *Fusarium* foi criado por Link em 1809 e, até o momento, não existe um sistema completo que possibilite a identificação das espécies de *Fusarium* sp.

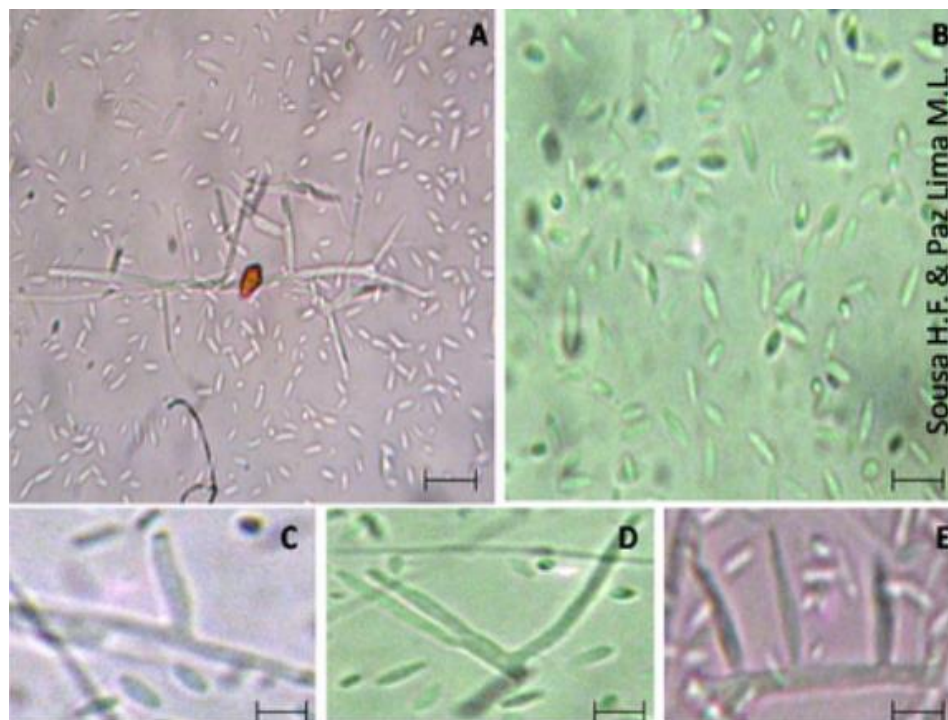
De acordo com Burgess *et al.*, (1994), os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* apresentam uma ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes, ocorrendo, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas, embora algumas espécies tenham uma íntima associação com os hospedeiros.

O gênero apresenta rápido crescimento e colônias com tons coloridos ou pálidos (creme a laranja ou do violeta a púrpura), com micélio aéreo e difuso, podendo ser produzida desde tom cinza sobre uma superfície branca, amarelo sobre uma superfície marrom, cor de rosa sobre uma superfície violeta ou cor de couro cru sobre uma superfície verde pálido. Os pigmentos são solúveis em água. (Domschet *et al.*, 1980).

São caracterizados por apresentar micélio aéreo filamentosos, denso e cotonoso, formado de hifas ramificadas, septadas. Apresentam dois tipos de conídios: macro e microconídios e estruturas assexuadas de resistências denominada clamidósporos. Quando presentes os clamidósporos podem ser terminais, intercalados, isolados ou em cadeias. Os conídios fusiformes são produzidos em esporodóquios. O gênero *Fusarium* sp apresenta conidióforos pouco ou bastante diferenciados, com ou sem ramificações. Em uma única

espécie é possível encontrar vários tipos de conídios. A célula conidiogênica é do tipo fiálide (Figura 3).

Os conídios nascem das fiálies e ficam agrupados ao seu redor através de uma substancia mucilaginosa, e são divididos em micronídios e macroconídios, geralmente a forma de barquinhos septados (McGEE, 1988; MENESE E OLIVEIRA, 1993). Morfologicamente, fungos do gênero *Fusarium* sp são de difícil identificação (CHANDRA *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Aspectos morfológicos de *Fusarium* sp; A- *Fusarium* sp, B- Conídios; C- Célula conidiogênica; D- Clamidosporo; E- Esporodóquio. **FONTE:** SOUZA, 2010.

De acordo com Ventura, (2000) as principais características usadas na identificação das espécies de *Fusarium* são: crescimento radial das culturas em meio de cultura, incubadas no escuro por 3 dias a 25e 30° C; presença ou ausência dos macroconídios, sua forma e características das células apical e basal presença ou ausência de microconídios e sua forma; forma e modo de formação dos microconídios; natureza da célula conidiogênica em que se originam os microconídios; presença ou ausência de clamidósporos; morfologia das culturas em meio BDA incubadas por 10-14 dias, em regime alternado luz/escuro, com temperaturas variando entre 25e 20°C e um fotoperíodo de 12 horas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Detectar fungos fitopatogênicos associados às sementes coletadas em três comunidades agrícolas no município de Humaitá, AM, com a finalidade de obter informações para o estabelecimento de futuras estratégias de controle de doenças nas áreas de produção.

#### **3.2. Específicos**

- Realizar um levantamento nas áreas de plantio sobre as culturas que são propagadas por sementes em três comunidades do município de Humaitá, AM.

-Identificar microrganismos fitopatogênicos encontrados nas sementes;

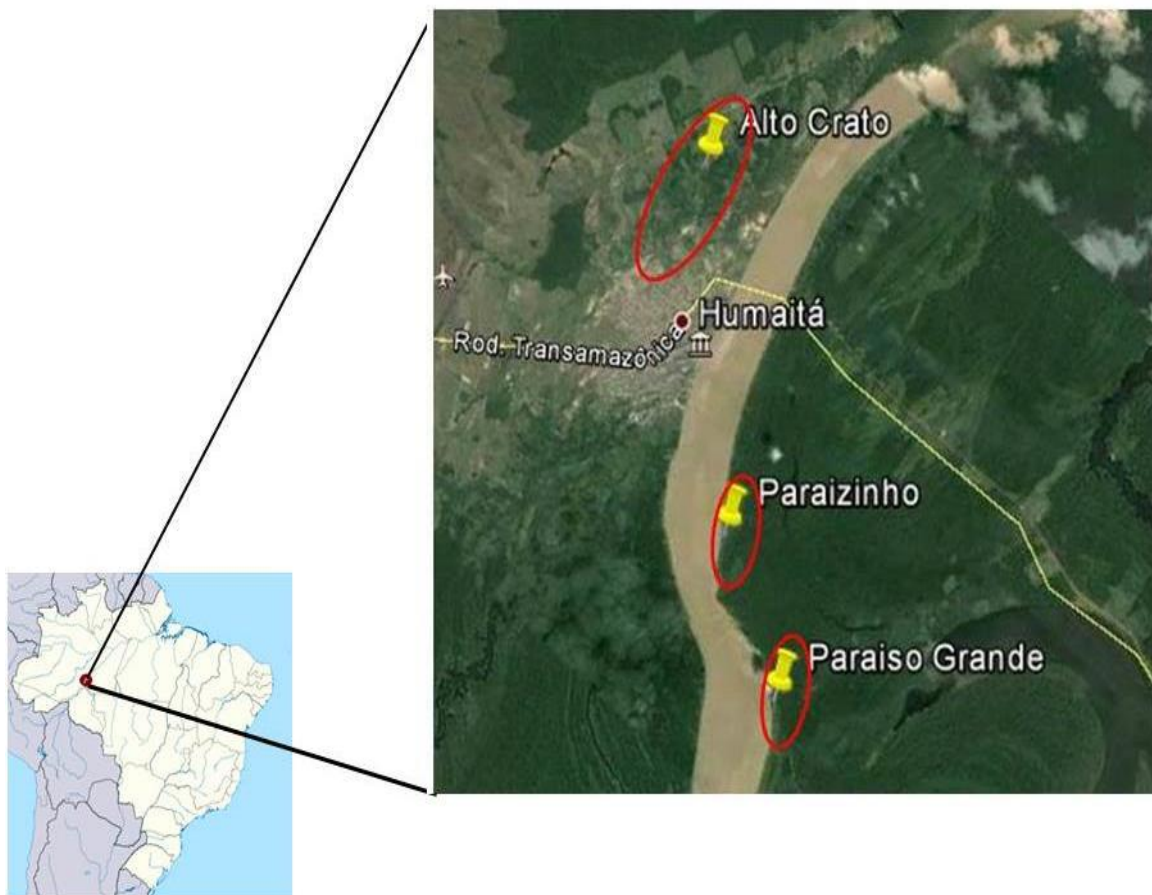
- Analisar o desenvolvimento microbiológico em diferentes meios de cultivo: Batata Dextrose Ágar (BDA), Ágar-Água e Papel filtro dos fitopatógenos.

-Avaliar em qual dos métodos utilizados houve maior crescimento de fungos fitopatogênicos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

O estudo foi realizado em áreas de produção pertencentes às comunidades do Paraizinho (07° 31' 59" S e 62° 59' 37" O), Paraiso Grande (07° 32' 55" S e 62° 58' 59" O) e no Alto Crato (07° 28' 53" S e 63° 02' 30" O), pertencentes ao município de Humaitá, localizados na região sul do estado do Amazonas. A escolha dessas comunidades foi feita com base em suas características econômicas que se baseiam predominantemente na exploração agrícola de caráter familiar (Figura 4).



**FIGURA 4:** Localização da área de estudo. **FONTE:** Google Earth, acesso em 12 julho 2013.

#### 4.2. Local de condução do experimento, levantamento das principais culturas e coleta das sementes.

O experimento foi realizado no laboratório de Fitossanidade do Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal do Amazonas (IEAA/UFAM), localizado em Humaitá-AM.

Foram selecionadas aleatoriamente sementes armazenadas pelos produtores pertencentes às comunidades já descritas anteriormente, conforme a Tabela 2. As sementes foram devidamente acondicionadas em sacos de papel, identificadas e encaminhadas ao laboratório, onde foram acomodadas em geladeira comum, a temperatura média de 16°C, até o início dos ensaios.

**TABELA 2:** Identificação das sementes analisadas.

| <b>AMOSTRA</b> | <b>NOME CIÊNTÍFICO</b>  | <b>FAMÍLIA BOTÂNICA</b> | <b>PROCEDÊNCIA</b> | <b>DATA DE COLETA</b> |
|----------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| Açaí           | <i>Euterpe oleracea</i> | Arecaceae               | Paraizinho         | Setembro de 2012      |
| Açaí           | <i>Euterpe oleracea</i> | Arecaceae               | Paraíso Grande     | Outubro de 2012       |
| Açaí           | <i>Euterpe oleracea</i> | Arecaceae               | Alto Crato         | Setembro de 2012      |
| Cacau          | <i>Theobromacacao</i>   | Malvaceae               | Paraíso Grande     | Outubro de 2012       |
| Café           | <i>Coffeaarábica</i>    | Rubiaceae               | Alto Crato         | Setembro de 2012      |
| Ingá           | <i>Ingá spp</i>         | Mimosaceae              | Alto Crato         | Setembro de 2012      |
| Melância       | <i>Citrulluslanatus</i> | Cucurbitaceae           | Paraíso Grande     | Outubro de 2012       |
| Milho          | <i>Zeamays</i>          | Poaceae                 | Paraizinho         | Setembro de 2012      |
| Milho          | <i>Zeamays</i>          | Poaceae                 | Paraíso Grande     | Outubro de 2012       |
| Urucum         | <i>Bixaorellana</i>     | Bixaceae                | Alto Crato         | Setembro de 2012      |

#### 4.3. Isolamento do material coletado

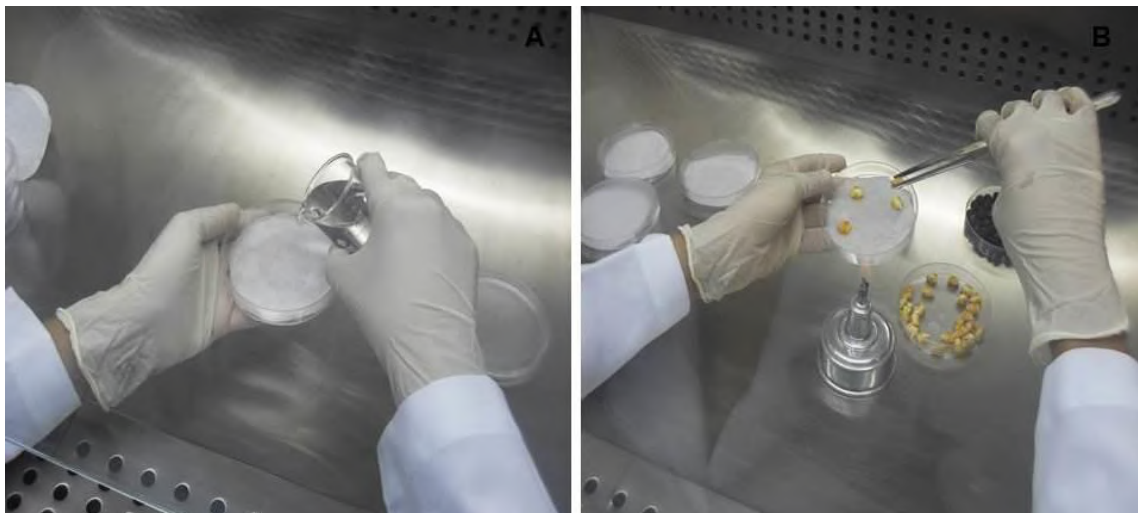
##### 4.3.1. Quantificação fúngica das sementes

O experimento comparou o crescimento de fungos fitopatogênicos em três diferentes métodos de isolamento: Batata, Dextrose e Ágar (BDA), Ágar sólido e Papel de filtro.

Inicialmente, antes de montar os testes, as sementes foram desinfestadas em ambiente asséptico. Para tanto, foram imersas em álcool a 70% ( $\pm$  30 segundos); em seguida, imergiram-nas numa solução de hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, lavando-as três vezes em água destilada autoclavada.

#### 4.3.2. Isolamento do fungo pelo método do Papel Filtro

A quantificação fúngica das sementes foi baseada no método do papel filtro, descrito por Lucca Filho, (1987). Inicialmente foi feita a assepsia da câmara de fluxo laminar, para eliminação de contaminações indesejáveis. Em seguida foram dispostas três folhas de papel de filtro esterilizado os quais foram umedecidos com água destilada esterilizada. Posteriormente, as sementes foram plaqueadas, dispondo em cada placa, com auxílio de uma pinça previamente flambada, quatro sementes. Cada parcela constou de 20 sementes distribuídas em 5 placas. Posteriormente as placas foram vedadas e identificadas com o nome da cultura, local e data de coleta. As sementes permaneceram incubadas por sete dias a 25 °C, em câmara de crescimento (BOD), com alternância de 12h diárias de luz. Após sete dias procedeu-se a repicagem dos fungos associados às sementes (Figura 5).



**FIGURA 5.** Isolamento do fungo em papel filtro. A- Placa de Petri com papel filtro esterilizado umedecido. B- Plaqueamento de sementes de milho pelo método do Papel Filtro. **FONTE:** SALES, M. C. G (2013).

#### 4.3.3. Isolamento do fungo pelo método de plaqueamento em meios de cultura sólido de Batata, Dextrose e Ágar (BDA) e Ágar

Nesta análise usou-se BDA comercial em pó, com as concentrações descritas na Tabela 3.

**TABELA3.** Componentes do meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA).

|                    | <b>COMPOSIÇÃO</b> |
|--------------------|-------------------|
| INFUSÃO DE BATATAS | 200,0 g           |
| DEXTROSE           | 20,0 g            |
| ÁGAR               | 15,0 g            |
| ÁGUA DESTILADA     | 1000,0 mL         |

Inicialmente, foi feita a assepsia da câmara de fluxo laminar e a etapa seguinte foi verter o meio de cultura em placas de Petri. Em seguida colocou-se uma quantidade de meio suficiente para que cobrisse totalmente o fundo da placa, deixando-a nivelada na horizontal evitando o acúmulo exagerado de meio em um único ponto da placa. Para isso, a borda do Erlenmeyer foi flambada no bico de Bunsen, evitando sempre o contato da borda do frasco com a borda da placa. As placas permaneceram em repouso até a solidificação do meio.

Após a solidificação do meio, as sementes foram plaqueadas, com auxílio de uma pinça previamente flambada e distribuídas de forma equidistantes, dispondo quatro sementes por placa, sendo que cada parcela constou de 20 sementes distribuídas em 5 placas. Posteriormente as placas foram vedadas e identificadas com o nome da cultura, local e data de coleta, e então foram colocadas a 25°C por sete dias com fotoperíodo de 12 horas utilizando-se câmara de crescimento (BOD). Em seguida foi realizada a repicagem dos fungos (Figura 6). O mesmo procedimento foi realizado para o isolamento do fungo em meio de cultura Ágar.





**FIGURA 6.** Isolamento das sementes em meio de cultura BDA. A- Plaqueamento com meio de cultura BDA; B- Fungos encubados em BOD. **FONTE:** SALES, M. C. G (2013).

#### **4.3.4. Repicagem para tubos de ensaio com o meio de cultura BDA**

Rotineiramente em laboratórios, as culturas fúngicas são armazenadas em tubos com meio inclinado, em geladeira (16°C), devido ocuparem menos espaço e apresentarem superfície exposta bem menor que a de uma placa, ficando menos sujeito as contaminações. O período de repicagem varia entre as espécies, mas no geral, as culturas devem ser repicadas a cada seis meses (GONÇALVEZ *et al*, 2007).

Para facilitar a identificação dos fungos, foi realizada a repicagem dos diferentes meios de cultura em tubos de ensaio contendo o meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar.

Inicialmente foi feita a assepsia da câmara de fluxo laminar por 20 minutos. Flambou-se a borda da placa e a alça imergindo-a no álcool 70%. Posteriormente foi retirado da placa de Petri um fragmento com cerca de 1cm<sup>2</sup>. Em seguida foi retirado o tampão de algodão e flambou-se novamente o tubo de ensaio. Depois o fragmento foi colocado o mais internamente possível do tubo de ensaio, evitando sempre o contato da alça nas partes internas do tubo, o qual foi vedado de forma rosqueada com algodão. Foi feito a identificação do tubo e posteriormente foi conservado em câmara de crescimento (BOD) a 25°C (Figura 7).

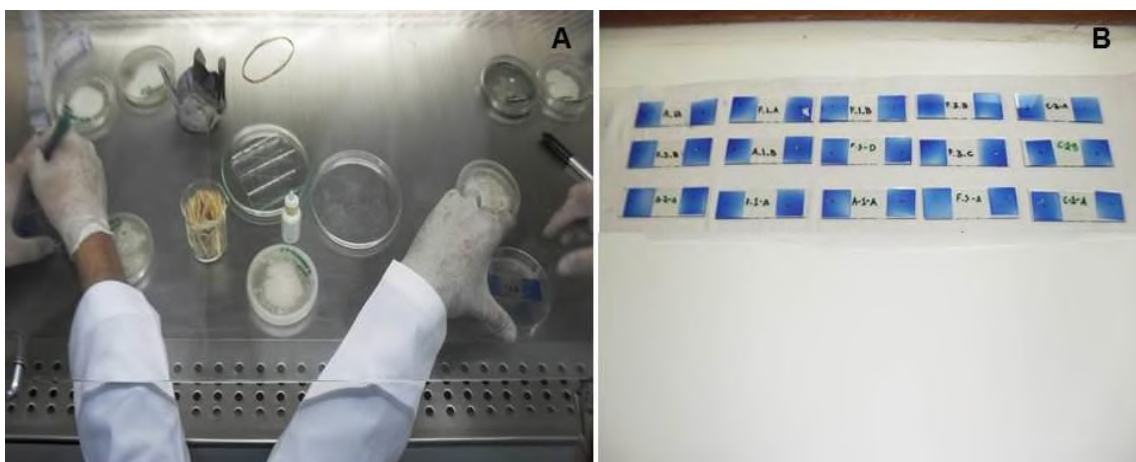




**FIGURA 7.** Repicagem dos fungos para tubos de ensaio A- Repicagem do material isolado; B- Crescimento fúngico em tubos de ensaio. **FONTE:** SALES, M. C. G (2013).

#### 4.3.5. Identificação dos fungos

A identificação foi feita pela confecção de lâminas, utilizando corante Safranina e observação das estruturas fúngicas em microscópio óptico. Para a classificação dos fungos até o nível de gênero foram utilizadas Chaves Taxonômicas (MENEZES, 1993). Procedeu-se a assepsia da câmara de fluxo com a utilização de álcool a 70% e algodão e lâminas e lamínulas. Em seguida, como auxílio de uma pinça flambada, retirou-se pequenas porções da colônia, a partir de quinze dias de crescimento fúngico, depositando-se sobre uma lâmina contendo uma gota de Safranina e, sobre estas, uma lamínula (Figura 8). A identificação dos microrganismos foi realizada em microscópio ótico após a preparação das lâminas.



**FIGURA 8.** Confecção das lâminas para identificação de fungos. A- Preparo das lâminas; B- Lâminas com corante safranina. **FONTE:** SALES, M. C. G (2013).

#### **4.3.6. Análise dos resultados**

A avaliação do crescimento fúngico em diferentes meios de cultura foi avaliado pelas porcentagens dos fungos identificados em cada repetição, na qual cada repetição equivale a 20% de incidência, assim, 5 repetições equivale a 100% de presença ou ausência de fungos. As porcentagens foram demonstradas através de gráficos e os dados serão submetidos à análise de variância pelo teste F, comparando as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

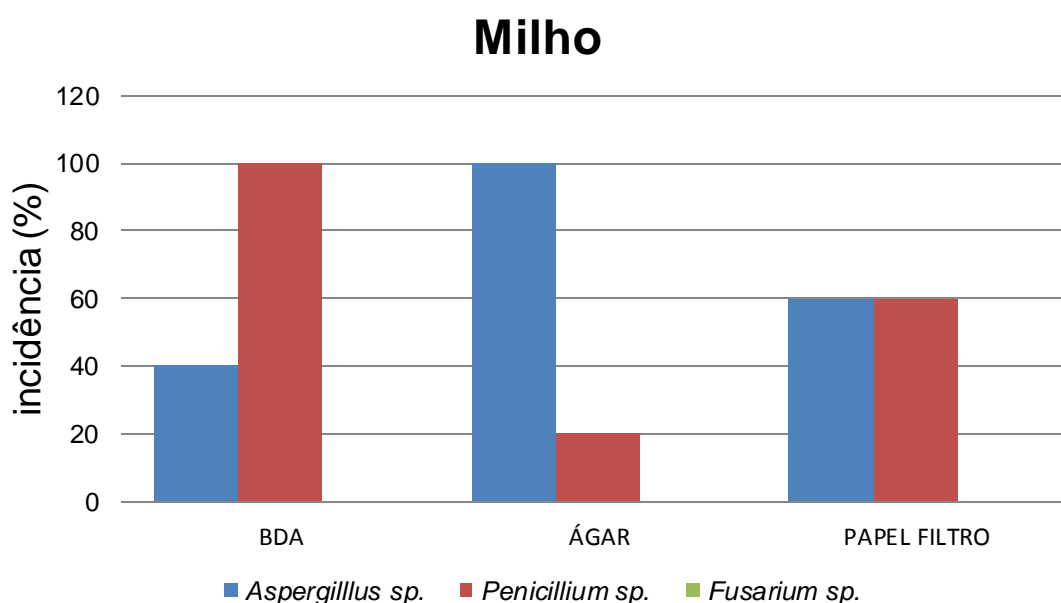
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização e identificação dos microrganismos patogênicos encontrados nas sementes

Através da observação das estruturas fúngicas em microscópio óptico foi diagnosticada a presença de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Segundo Pereira *et al.* (2009), isto pode ser elucidado pelo fato de muitas espécies de fungos sobreviverem utilizando os grãos como substrato, no entanto as espécies *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp*, são as mais encontradas, sendo em maior destaque as duas primeiras.

### 5.2. Identificação de fungos patogênicos em sementes coletadas na comunidade Paraizinho

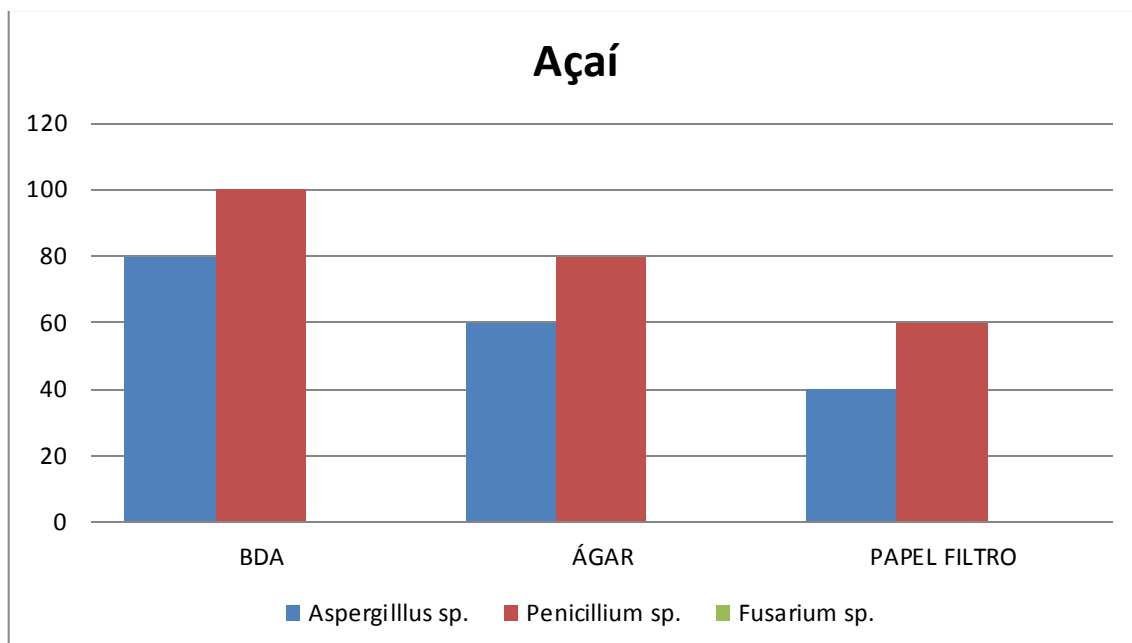
Os resultados indicam a presença de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em todos os meios de cultura avaliados, indicando incidência de 100% de *Aspergillus sp* em meio de cultura Ágar sólido e 40% em meio BDA. Os fungos do gênero *Penicillium sp* apresentaram incidência de 100% em meio BDA, porém uma média de 20% em meio de cultura Ágar, enquanto que em papel filtro o crescimento de ambos os fungos não ultrapassou 60% na cultura do milho (Figura 9).



**FIGURA 9:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp* em sementes armazenadas de milho na comunidade Paraizinho, em meios de cultura BDA, Ágar e Papel de Filtro.

Para a detecção de *Penicillium* sp o método de plaqueamento em BDA e Papel filtro foram mais eficientes, sendo que o fungo ocorreu em um maior número de repetições em meio BDA. Provavelmente porque este meio de cultura é mais rico em nutrientes, o que não ocorre em Papel filtro e Ágar. Portanto, pode-se considerar que dos três métodos testados, os mais eficientes na avaliação do crescimento patogênico de *Aspergillus* sp foi o meio de cultura BDA, seguido do papel de filtro. Como também verificado por Ruiz Filho *et al.* (2004), que estudando a incidência de fungos fitopatogênicos em sementes de cedro (*Cedrelafissilis*), constataram que, tanto o método de detecção em papel-filtro quanto em meio BDA, foram eficientes na detecção de *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp em sementes de cedro. Para a detecção de *Aspergillus* sp os três métodos de isolamento foram eficientes na detecção do fungo, porém no meio Ágar houve maior crescimento patogênico, seguido do papel filtro.

A amostra de açaí (Figura 10), indica a presença de fungos dos gêneros de *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp em todos os meios de cultura avaliados, porém a maior incidência de fungos em relação as médias das repetições foi obtida em meio de cultura BDA, que apresentou 100% das repetições contaminadas por *Penicillium* sp e 80% contaminadas por *Aspergillus* sp. Provavelmente isso ocorre devido este meio de cultura ser mais rico em nutrientes, o que não ocorre em Papel filtro e Ágar. Além de ser um meio rico, de acordo com Neergaad, (1979), os meios de cultura agarizados exercem maior controle sobre a população bacteriana que possa estar nas sementes, facilitando também a identificação dos fungos. Em meio de cultura Ágar prevaleceu o fungo *Penicillium* sp com 80% de contaminação e *Aspergillus* sp com 60%. As sementes isoladas em papel de filtro obtiveram médias de 60% para *Penicillium* sp e 40% para *Aspergillus* sp. Em algumas destas sementes, antes da montagem dos experimentos, foi facilmente observada a deterioração a olho nú. De acordo com Popinigis (1977), isso acontece, pois as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* se encontram entre os principais agentes deterioradores de sementes.

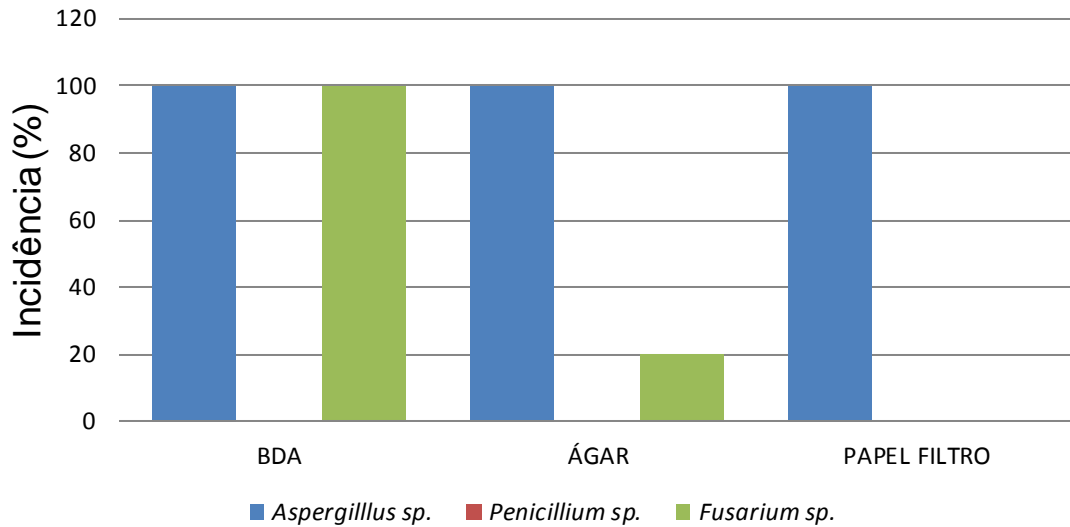


**FIGURA 10:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus* sp *Penicillium* sp e *Fusarium* sp em sementes armazenadas de Açaí na comunidade Paraizinho, em meios de BDA, ÁGAR e Papel de Filtro.

De acordo com os resultados obtidos, percebe-se que fungos do gênero *Penicillium* obtiveram médias superiores de crescimento quando comparados com os fungos do gênero *Aspergillus* nos diferentes meios de cultivo testados.

Pela análise dos dados explícitos na figura 11 em sementes de Urucum, verifica-se que todas as amostras de sementes isoladas nos diferentes meios de cultura estão contaminadas com fungos do gênero *Aspergillus* obtendo-se uma média de 100%. Fungos do gênero *Fusarium* foram identificados em todas as repetições em meio BDA. Em meio Ágar esteve presente em apenas 20% das amostras, porém o isolamento em Papel de Filtro demonstrou não ter sensibilidade suficiente para detectar o fungo ou provavelmente as sementes contaminadas foram dispostas apenas em meio de cultura BDA e Ágar, visto que foram selecionadas aleatoriamente.

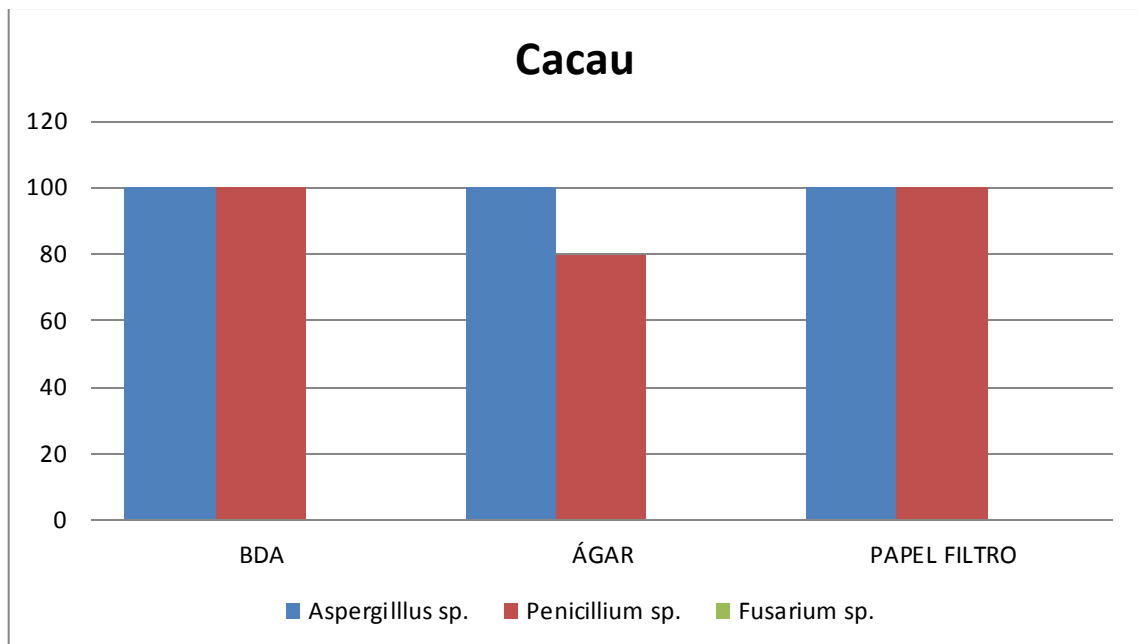
## Urucum



**FIGURA 11:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* em sementes armazenadas de Açaí na comunidade Paraizinho, em meios de BDA, ÁGAR e Papel de Filtro.

### 5.3. Identificação de fungos fitopatogênicos em sementes coletada na comunidade Paraíso Grande

A Figura 12 demonstra a alta incidência de *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.* em sementes de cacau, indicando que ambos os fungos estão presentes em todas as sementes isoladas em BDA e Papel de Filtro. Porém em meio Ágar, a incidência de *Penicillium sp.* não ultrapassou 80% das amostras. Segundo Puzi (2000), a alta incidência de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* deve-se ao fato de constituírem os fungos que proliferam com maior frequência nos grãos armazenados quando submetidos a umidade relativa acima de 65 ou 70%.



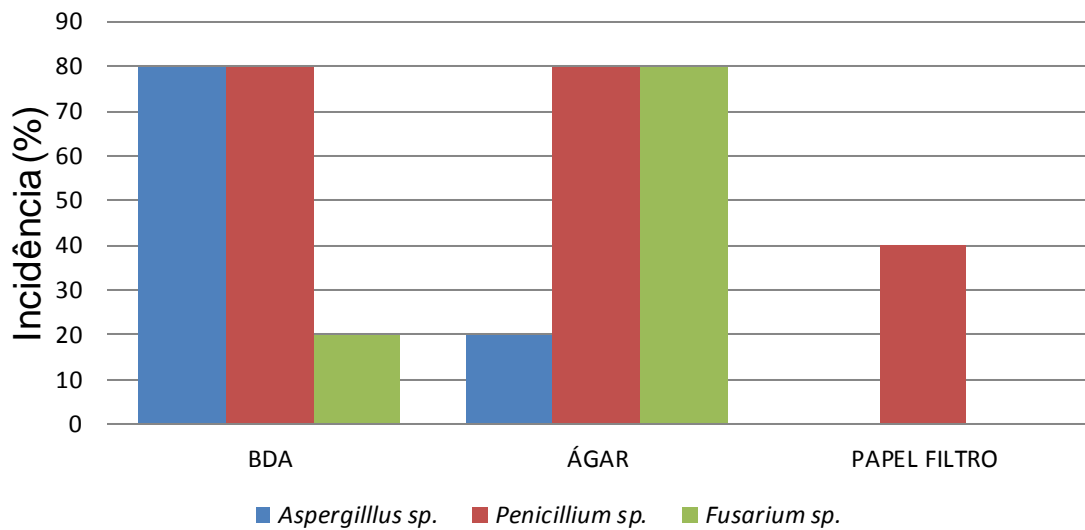
**FIGURA 12:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp em sementes armazenadas de cacau na comunidade Paraíso Grande, em meios de BDA, ÁGAR e Papel de Filtro.

Em sementes de açaí (Figura 13), os resultados indicam a incidência de *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp em meio BDA apresentando porcentagens de 80%. Em meio Ágar a porcentagem se mantém para o fungo *Penicillium* sp e é reduzido a 20% para o fungo *Aspergillus* sp. A incidência de *Fusarium* sp em meio ágar sobressaiu a incidência do mesmo em meio BDA. Segundo Neves *et al.* (2009), a alta incidência conjunta de *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp conferem baixo poder de germinação às sementes.

A ausência de *Fusarium* sp nas amostras de papel filtro pode ser explicada por Reis *et al.*, (1999), que diz que a incidência de contaminantes, como fungos e bactérias, que crescem rapidamente neste substrato, pode impedir a frutificação dos fungos-alvo, dificultando a sua identificação e quantificação, sobretudo os de crescimento.

Não foram encontrados dados na literatura que explicasse a eficiência do meio de cultura Ágar em relação ao BDA em sementes de açaí.

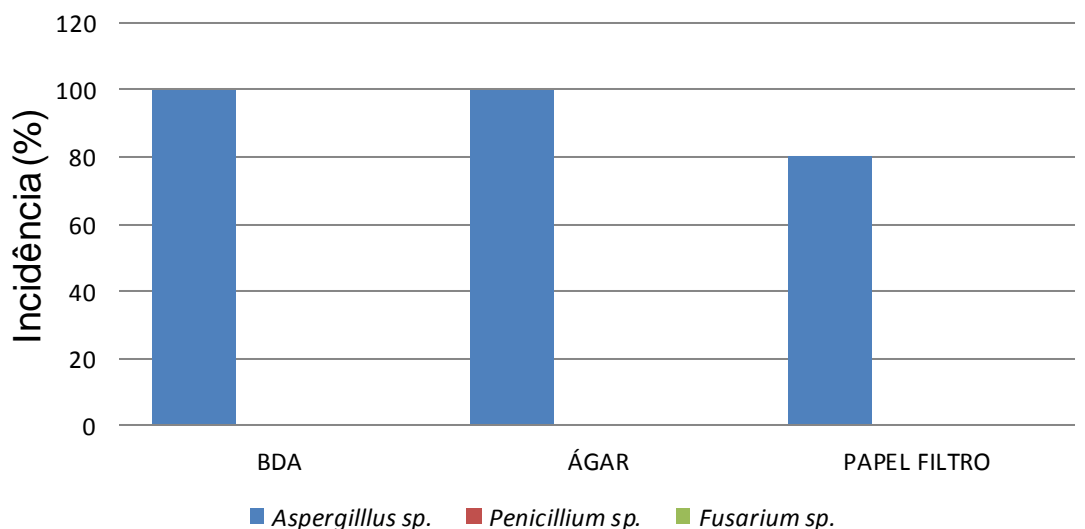
## Açaí



**FIGURA 13:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* em sementes armazenadas de açaí na comunidade Paraíso Grande, em meio de cultura BDA, ÁGAR e Papel Filtro

A Figura 14 mostra que as sementes armazenadas de melancia apresentaram alta infestação por *Aspergillus sp.* nos diferentes meios de cultura testado, sendo o meio de cultura BDA e ÁGAR os mais eficientes na detecção do fungo. Não foi constatada a presença de fungos pertencentes as gênero *Penicillium* e *Fusarium*, provavelmente porquê as sementes não encontravam-se contaminadas por estes fungos.

## Melância

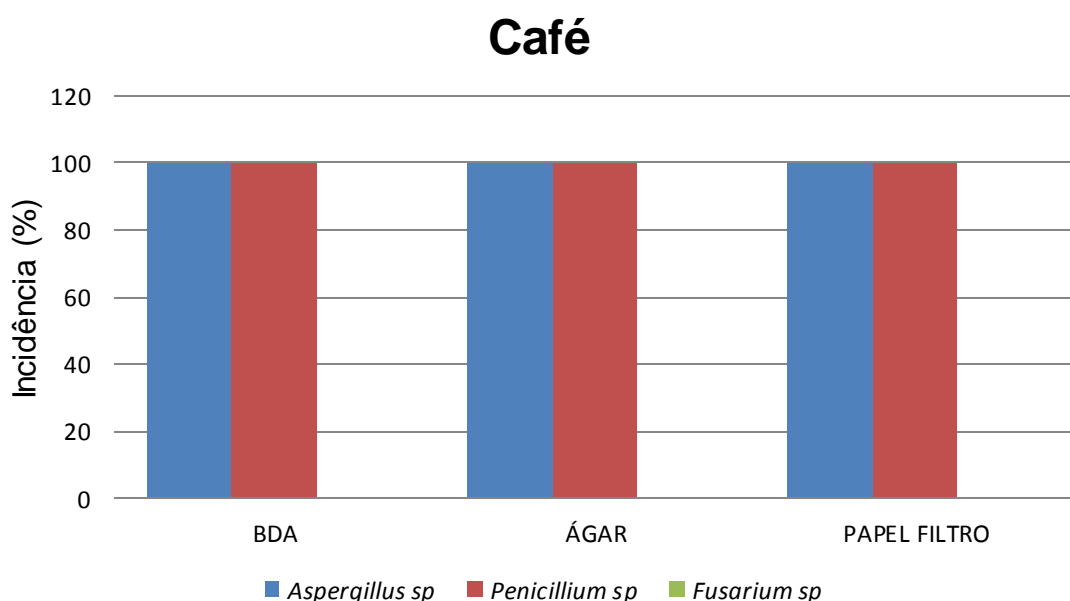


**FIGURA 14:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus sp.*, *Penicillius sp.* e *Fusarium sp.* em sementes armazenadas de melância na comunidade Paraíso Grande, em meios de BDA, ÁGAR e Papel de Filtro.



#### 5.4. Identificação de fungos fitopatogênicos em sementes coletadas na comunidade Alto Crato

Em sementes de café (Figura 15), os resultados indicam alta porcentagem de *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* em todos os meios de cultura testado, indicando que estas sementes estão inviáveis para serem utilizadas no plantio da safra seguinte. A presença de patógenos nas sementes, independentemente de sua transmissibilidade, pode afetar o vigor e o rendimento em campo (Zorato & Henning, 2001; Luz, 2003).

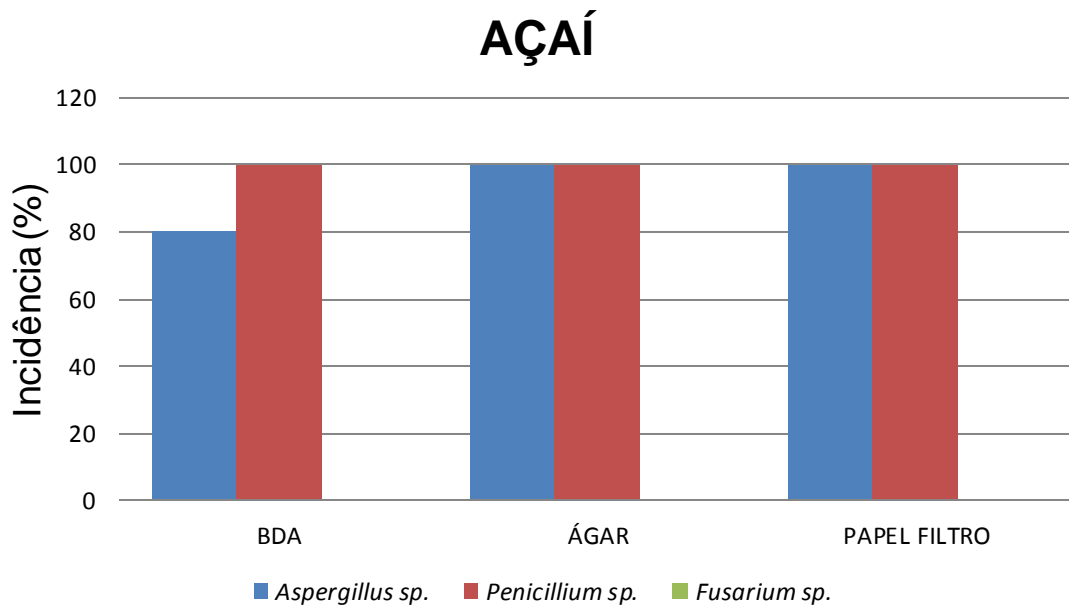


**FIGURA 15:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp* em sementes armazenadas de café na comunidade Alto Crato, em meios de BDA, ÁGAR e Papel de Filtro.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* geralmente estão presentes em sementes recém-colhidas, em porcentagens muito baixas, e são capazes de sobreviver em ambientes com baixa umidade, proliferando-se em sucessão aos fungos de campo e causando a deterioração das sementes, culminando com a perda da viabilidade e do valor comercial das mesmas (Berjak *et al.*, 1987; Carvalho & Nakagawa 1988).

As porcentagens obtidas indicam que os três métodos de isolamento foram eficientes na detecção de ambos os fungos, não havendo contaminação por *Fusarium sp* nas sementes de café.

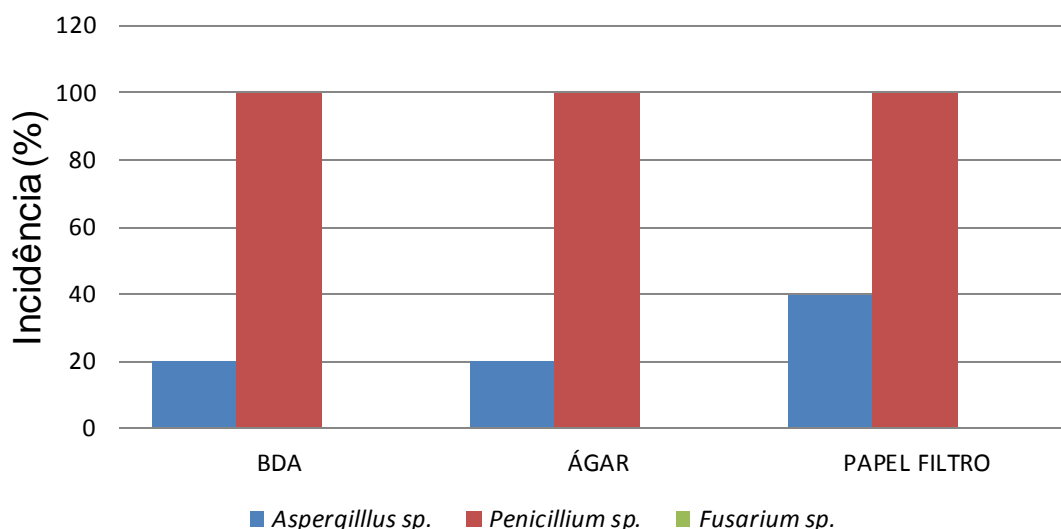
A figura 16 mostra que, o isolamento de sementes de açaí obtiveram resultados quase semelhantes ao isolamento de sementes de café, exceto pela porcentagem de *Aspergillus* sp. em meio de cultura BDA, que atingiu 80%. Porém pode-se concluir que as sementes apresentam alta infestação por *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp e que os meios de cultura avaliados foram eficientes na detecção do fungo.



**FIGURA 16:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp em sementes armazenadas de açaí na comunidade Alto Crato, em meios de BDA, ÁGAR e Papel de Filtro.

Pela análise dos dados (Figura 17), o desenvolvimento de *Penicillium* sp foi significativo em todos os meios de cultura testado. Porém a porcentagens de espécies de *Aspergillus* sp não ultrapassou 40% em papel filtro e 20% em BDA e Ágar. Bilia *et al.*, (1999), avaliando o crescimento patogênico sob concentrações diferentes de água verificou que há acréscimos da atividade metabólica e da proliferação de *Aspergillus* sp e de *Penicillium* sp, em sementes de ingá armazenadas com 50% de água.

## Ingá



**FIGURA 17:** Porcentagem de incidência de *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* em sementes armazenadas de Ingá na comunidade Alto Crato, em meios de BDA, ÁGAR e Papel de Filtro.

### 5.5. Análises das porcentagens obtidas para o desenvolvimento fúngico em meio de cultura BDA, Ágar e Papel filtro.

O coeficiente de variação apresentou valor baixo de 14,70, afirmando a precisão do experimento, conforme a tabela 4.

**TABELA 4.** Análise de variância das comunidades e meios de cultura referentes à incidência de fungos fitopatogênicos

| FV               | GL         | SQ           | QM         | Fc    | Pr>Fc  |
|------------------|------------|--------------|------------|-------|--------|
| comunidade       | 2          | 1534.814815  | 767.407407 | 7.115 | 0.0012 |
| meios de cultura | 2          | 1143.703704  | 571.851852 | 5.302 | 0.0061 |
| erro             | 130        | 14020.740741 | 107.851852 |       |        |
| Total corrigido  | 134        | 16699.259259 |            |       |        |
| CV (%) =         | 14.70      |              |            |       |        |
| Média geral:     | 29.9259259 |              |            |       |        |

O maior crescimento de fungos fitopatogênicos foi identificado na comunidade Alto Crato. Embora as sementes coletadas na comunidade não tenham manifestado a presença do fungo *Fusarium sp.*, foi detectado uma alta incidência de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* nas amostras analisadas. No

entanto, as amostras coletadas na comunidade Paraizinho e Paraíso Grande não apresentaram diferença significativa entre si.

Os meios de culturas BDA e Ágar não apresentaram diferença significativa entre si. Ambos foram eficientes na detecção dos fungos. O papel filtro demonstrou ser o menos eficiente na detecção de *Aspergillus*, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp, o que pode ser observado na tabela 5.

**TABELA 5.** Resultado da análise de variância das comunidades e meios de cultura referentes à incidência de fungos fitopatogênicos

| Comunidades    | INCIDNCIA  | meios de cultura | INCIDNCIA |
|----------------|------------|------------------|-----------|
| Auto Crato     | 34,6666 a  | BDA              | 33,3333 a |
| Paraíso grande | 28,0000 b  | Ágar             | 30,2222 a |
| Paraizinho     | 27, 1111 b | Papel Filtro     | 26,222 b  |

Medias seguidas de mesma letra na coluna não difere significativamente pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 6. CONCLUSÃO

1. As principais culturas propagadas por sementes nas comunidades Paraizinho, Paraíso Grande e Alto Crato são: milho, açaí, urucum; cacau, café, ingá.
2. A presença do gênero *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp ocorreu com frequência nas sementes das comunidades em estudo. Não foi identificado a presença do gênero *Fusarium* sp em sementes coletadas na comunidade Alto Crato.
3. A maior incidência de fungos ocorreu em meio de cultura BDA e Ágar.

## 7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, V.K & SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology**. 2 ed. CRC Press. Lewis Publishers. Boca Raton. Florida. 1997.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 2005. 922 p.

BELLETTINI, N.M.T.; ENDO, R.M.; MIGLIORANZA, E.; SANTIAGO, D.C. **Parogenicidade de fungos associados às sementes e plântulas de amendoim** cv. Tatu. Ciências Agrárias, Londrina, V. 26 num 2, 167-172, 2005.

BENNET, J. W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. 2010. Disponível em: <<http://www.open-access-biology.com/aspergillus/aspergillusch1.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

BERJAK, P; FERNADES, J. MNASSER, L. C.; WETEZ, M. M.; Stored seeds: **The problems caused by microorganisms** (With particular reference to the fungi) In: Seed pathology: International advance course, proceedings. Brasília: Abrates, 1987. p. 38-50.

BILIA, D. A. C; MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A. D. L. C. **Desiccation tolerance and storability of *gingauruguensis* seed**. Seed Science and technology, Zurich, v.27, n.1, p. 77-89, 1999.

BIS BRASIL INDUSTRIAL SOLUTIONS, 2008. Conheça a aflatoxina B1. Disponível em: <<http://www.bisbrasil.com.br/dicas/dicas/aflatoxina.html>> Acesso em: Julho de 2013.

BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S. GOTT, K.P. & BACKHOUSE, D. Laboratory **manual for *Fusarium*** research, Sydney, University of Sydney. 1994.

CARNEIRO, J.W.P. *Steviarebaudiana* (Bert.) Bertoni: **produção de sementes**. Maringá: U.E.M., 1990. 65p.

CARVALHO, M. V. **Ocorrência, contágio e associação em sementes de milho (Zeamays L.)**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal,1997.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência,tecnologia e produção. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill,1988.

CASA, R.T, REIS, E. M, MOREIRA, E.N. **Transmissão de fungos em sementes de cereais de inverno e milho: implicações epidemiológicas**. In: ZAMBOLIM, L. *Sementes: qualidade fitossanitária*. Viçosa: UFV / DFP, 2005. p. 55-71.

CHALFOUN S.M. & BATISTA L.R., **Fungos associados a frutos e grãos do café, *Aspergillus*&*Penicillium*** 2003.

CHANDRA, N.S.; WULFF, E.G.; UDAYASHANKAR, A.C.; NANDINI, B.P.; NIRANJANA, S.R.; MORTENSEN, C.N.; PRAKASH, H.S..**Prospects of molecular markers** in Fusariumspecies diversity.Applied Microbiology Biotechnology, n.5, v. 90, p. 1625 – 1639, abr.2011.

COBERLLINI, L.G. Aborto por *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus. nigerem* bovinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.v. 23., Rio de Janeiro, RJ., 2003.

EMBRAPA, **Centro de pesquisa Agroflorestal do Acre..** Recomendações básicas para a produção de sementes de milho no nível de pequena propriedade rural. Recomendações técnicas. (Embrapa - CPAO. Circular técnica, 5).

DOMSC, K. H.; GAMS, W; ANDERSON , T. H. Compendium of soil fungi. New Your: **Academic Press**, 1980, 859p.

EMBRAPA, **Centro de pesquisa Agropecuária** do Oeste (Dourados, MS). Milho: Informações Técnicas. Dourados, 1997. p.222 (Embrapa - CPAO. Circular técnica, 5).

FRANCO, D. F.; RIBEIRO, A. S.; NUNES, C. D.; FERREIRA, E. Fungos Associados a Sementes de Arroz Irrigado. Ver.**Bras. De Agrobiência**, v. 7 n3, p. 235-236, 2001.

GONÇALVEZ, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.**Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase a fungos fitopatogênicos**. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Org.). Métodos em fitopatologia. Viçosa, MG: UFV, 2007. v. 1. p. 92-102. HAGLE, S.

INDEX FUNGORUM Disponível em:  
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Acesso em: 06/08/2013.

ITO, M.F.; CASTRO, J. L.; MENTEN, J.O.M.; MORAES, MH. D. Importância do uso de sementes sadias e feijão e tratamento químico. **O Agrônomo, Campinas**, vol . 55, n. 1, 2003.

ITO, M.F.; TANAKA, M.A.S. **Soja - principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. p. 1 - 2.

KENNEDY, B.W. The occurrence of Aspergillus sp ponstored seeds. IN: Seed Pathology .IAPAR, 1979. P. 257-261.

Kimati, H. Fungos. In: GALLI, F. TOKESHI, H. CARVALHO, PCT.,BALMER, TL.,CARDOSO, CON, Salgado, CL., Kugner, TL., Cardoso, EJV.B., BERGAMIM Filho, A. **Manual de Fitopatologia**. Ed. Agronômica Ceres, 2 ed.São Paulo, SP, 1978.



KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia, New York*, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Koneman Diagnóstico Microbiológico**: Texto e atlas colorido 6ª edição, Editora Guanabara Koogan, 2008.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Agentes causais. Fungos. In: **Manual de Fitopatologia**. Princípios e Conceitos BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H. ; AMORIM, L. (Eds). Agr. Ceres, v. 1, p. 67-74, 1995.

LAZZARI, F. A., **Monitoramento de fungos em milhos de grãos, grãos e fubá**, v. 15, São Paulo, SP, 1998. site: [http<www.scielo.com>](http://www.scielo.com), acesso em 04 de agosto de 2013.

LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. (Eds.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.

LUZ, W. C. **Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil** Circular Técnica. Centro Nacional de Pesquisa do Trigo, Passo Fundo, n.5, p. 1-2, 1995.

LUZ, W.C. da. Combinação dos tratamentos biológico e químico de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira** 28:37-40. 2003.

MACHADO, J. C. **Sementes Tecnologia de Produção**. Informe agropecuário. Belo Horizonte, 91 p. 1982.

MACHADO, J.C. Tratamento de semente de feijão. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 2. Resumos Campinas: **Fundação Cargill**, 1986. p.64.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.

MACHADO, J.C. **Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes**. Revisão Anual de Patologia de Plantas,v.2, p.229-262, 1994.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE. 138 p. 2000.

McGEE, D. C. Maize diseases: a reference source for seed technologists. Saint Paul: *The AmericanPhytopathological* Society, 1988. 150p.

MENDES, M. A. S; SILVA, V. L.; DINESE, J.C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F. & CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília. Embrapa- SP/Embrapa Cenargen. 1998.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M. de **Fungos fitopatogênicos**. Pernambuco: Imprensa Universitária da UFRPE, 1993. 277p.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M. de **Fungos fitopatogênicos**. Pernambuco: Imprensa Universitária da UFRPE, 1993. 277p.

Menezes, M. & Silva-Hanlin, D.M.W. Guia prático para fungos fitopatogênicos.Recife: UFRPE, 1997. 106p;

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

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**.Piracicaba: ESALQ / FEALQ, 1991. 312p.

MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**..São Paulo: Ciba Agro, 1995. 321p.

MENTEN, J.O.M. Tratamento de sementes. In Soave, J., Oliveira, M.R.M. & Menten, J.O.M. (Ed.). Tratamento químico de sementes. **Anais**, 4<sup>to</sup> Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes. Gramado, RS. 1996. pp.3-23.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à fitopatologia**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 190 p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The MacMillan Press, 1977.

NEERGAARD, P. - **Seed Pathology**. London: Macmillan, 1979. 839 p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. v.1. London. The Macmillan Press. 1983.

NEVES, J.M.G.; SILVA, H.P.; BRANDÃO JUNIOR, D.S.; MARTINS, E.R.; NUNES, U.R. Padronização do teste de germinação para sementes de pinhão manso. **Revista Caatinga**, v.22, n.4, p.76-80, 2009b.

OLIVEIRA, A. S. ESTUDOS EM DOENÇAS DE PLANTAS - IFGoiano câmpus Urutaí. 2010. Disponível em [http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de\\_4199.html](http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de_4199.html). Acessado em: Julho de 2013.

PANTALEÓN, F. I. G. SALINAS, R. J.; EGEA, J. S.; VILLAREJO, J. M.; CRESPO, F. L. **Mohos em los alimentos**. Cordoba: ACTA-A Tipografia Católica, 1988. 88p.

POPINIGIS, F. 1977. **Fisiologia da semente**. Ministério da Agricultura, AGIPAN, Brasília, Brasil, 289pp.

Portal Patologia de sementes. Disponível. <[http://faem.ufpel.edu.br/dfs/patologiasementes/cgi-bin/semntes/detalhes.cgi?p\\_raga=90](http://faem.ufpel.edu.br/dfs/patologiasementes/cgi-bin/semntes/detalhes.cgi?p_raga=90)> acessado agosto de 2013.

PUTZKE, J.; PUTZKE, Marisa Terezinha Lopes. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998.

PUZZI, D. **Abastecimento e Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2000. 666 p.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Ciclos biológicos e epidemiológicos: Aspergillus, Penicillium, Diplodia e Fusarium**. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M. L. (Org.) SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, Ponta Grossa. Artigos... São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p.9-20.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Ciclos biológicos e epidemiologia: Aspergillus, Penicillium, Diplodia e Fusarium**. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Org.) SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, Ponta Grossa. Artigos...São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p.9-20.

REIS,E.M.&CASA,R.T. **Patologia de sementes de cereais de inverno**.PassoFundo.AldeiaNorteeditora.1998. 88p.

RESENDE, N. A. Estudos em doenças de plantas - IFGoiano câmpus Urutaí. 2010. Disponível em [http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de\\_4199.html](http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de_4199.html). Acessado em: Julho de 2013.

RODRIGUES, T. M.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Assepsia de sementes de bromélia imperial para cultivo in vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: ABCTP, p. 251.

RUIZ FILHO, R. R. et al. **Fungos associados às sementes de cedro**. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 30, n. 4,p. 494-496, 2004.

SAMPSON, R.A.; PITT, J.I. **Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification**.New York: Plenum Press, 1990.

SANTIN, 1991 apud HESSELTINE. **Fungos de Pré e Pós Colheita e a Qualidade de Grãos de Milho**. Porto Alegre 2001.p.27.

SCHERER, M.; BAUDET, L. Armazenamento de sementes de feijão em embalagem resistente à umidade. In: REUNIÃO ANUAL DO FEIJÃO E OUTRAS LEGUMINOSAS DE GRÃOS ALIMENTÍCIOS, XXIII. Ijuí, RS, 1990. **Anais**. Ijuí, RS, 1990, p.81-188.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

SOUZA, H. F. Estudos em doenças de plantas - IFGoiano câmpus Urutaí. 2010. Disponível em [http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de\\_4199.html](http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de_4199.html). Acessado em: Julho de 2013.

TANAKA, M. A. S. **Doenças em sementes de soja**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 36–48, 1982.

TANAKA, M. A. S.; MAEDA, J. A.; PLAZAS, I. H. A. Z. **Microflora Fúngica de Sementes de Milho em Ambientes de Armazenamento**. Sci. Agric..v. 58 n. 3 Piracicaba, 2001.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C. Influência de *ColletotrichumGossypii* South. no desenvolvimento inicial do algodão (*Gossypiumhirsutum*L.) em função da localização do inóculo e desinfestação das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 9-13, 1997.

VARGA, J. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 627–640, 2004.

VENTURA, J.A. Taxonomia *Fusarium* e seus segregados. Parte II-Chave para identificação. Revisão **Anual** de Patologia de Plantas. ed. Luz, W.C. 8: 303-338, 2000.

WETZEL, M. V. S. Fungos de Armazenamento. In. **Patologia de sementes**. J. SOAVE e WETZEL, M. M. V. S. Campinas. Fundação Cargill. P. 260-75, 1987.

ZORATO, M.F. & HENNING, A.A. Influência de tratamentos com fungicidas antecipados, aplicados em diferentes épocas de armazenamento, sobre a qualidade de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*23:236-244. 2001.