

INIBIÇÃO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE TRIGO E MILHO EM TESTE DE SANIDADE EM SUBSTRATO DE PAPEL

INHIBITION OF WHEAT AND CORN (SEED) GERMINATION IN BLOTTER TEST

FARIAS, Cândida R. J.¹; DEL PONTE, Emerson M.²; DAL MAGRO, Taísa³; PIEROBOM, Carlos R.⁴

RESUMO

A restrição hídrica, para inibição de germinação, em teste de substrato papel tem sido testada em sementes de algumas plantas com o objetivo de evitar o movimento das sementes durante o período de incubação, facilitando a operacionalidade da análise sob microscópio estereoscópico e evitando contaminações. No presente trabalho foram testados os níveis de restrição (-0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa) de manitol, KCl, NaCl, sacarose e PEG8000 (Polietilenoglicol 8000), na forma de solução líquida. Essas soluções umedeceram o substrato papel de filtro onde foram colocadas as sementes de milho e trigo. Os resultados foram comparados com a testemunha em água destilada, congelamento e 2,4-D, avaliando-se o efeito sobre a incidência dos microorganismos e a germinação das sementes. Em trigo, todos os níveis de restrição com sacarose e KCl testados inibiram a germinação, enquanto que com PEG8000 e NaCl, só mostrou inibição significativa nos níveis -0,6; -0,8 e -1,0 MPa. Em milho, a inibição de germinação completa foi atingida somente com KCl a -0,8 e -1,0 MPa e com NaCl a -1,0 MPa. O nível de incidência de fungos em trigo mostrou-se semelhante às testemunhas em todos os níveis de potenciais osmóticos com exceção de PEG8000 a -0,4 MPa, onde foi verificada alta incidência de *Trichoderma* sp. Em milho o nível de incidência de fungos também se manteve em relação às testemunhas. A restrição hídrica, especialmente com os solutos NaCl e KCl, por serem de baixo custo, parece ser uma técnica eficiente a ser usada habitualmente em laboratórios de análise sanitária de sementes.

Palavras-chave: restrição hídrica, análise sanitária, fungos, blotter test.

INTRODUÇÃO

Dentre as metodologias de testes de sanidade para a detecção de fungos em sementes, os testes com incubação sob condições controladas tem o objetivo de facilitar o crescimento e esporulação dos fungos e a indução de sintomas, o que permite uma identificação rápida e segura do microorganismo envolvido. Os métodos desenvolvidos nos últimos anos incluem técnicas que variam em grau de complexidade. Dentre os métodos considerados simples cita-se o do substrato de papel com suas variações na metodologia. Atualmente, este método é de uso rotineiro em laboratórios de análise por preencher os requisitos de rapidez, simplicidade, baixo custo e permitir o levantamento da microflora associada à diversos tipos de sementes,

quantificação do inóculo e avaliação preliminar da germinação (LUCCA FILHO, 1987; TANAKA et al., 2001).

Dentre as variações deste teste, a inibição da germinação das sementes é um procedimento de grande utilidade quando analisa-se sementes de espécies que apresentam rápida germinação. A germinação dificulta a análise e identificação dos fungos e provoca contaminações das sementes adjacentes, pelo movimento das mesmas. Atualmente, a inibição da germinação é feita com a adição do sal de sódio do ácido 2,4 - diclorofenoxiacetato de sódio - herbicida 2,4-D - na solução de embebição do papel ou com o congelamento das sementes a -20°C, por 24 horas no segundo dia da incubação, segundo os métodos descritos a mais de três décadas (LIMONARD, 1968; NEERGAARD, 1977).

No entanto, é altamente desejável um sistema alternativo ao uso do 2,4 - D, por ser um produto tóxico, tanto para laboratoristas, quanto aos fungos, quando utilizado em altas concentrações (LIMONARD, 1968). O congelamento, por sua vez, apresenta maior complexidade na operação e provoca a morte das sementes pela ruptura das células, produzindo exsudatos que são drenados no substrato de papel, podendo provocar contaminações secundárias.

Recentemente, tem sido testada a indução de restrição hídrica para controlar a germinação da semente no teste de sanidade em substrato de papel e em meio BDA (batata+dextrose+agar) (COUTINHO, 2000). Este método baseia-se na alteração do potencial osmótico da solução de embebição do substrato, ou do meio de cultura, através da adição de solutos, ajustando-o a potenciais hídricos que não permitam umidade suficiente para que ocorra a emergência da radícula. Alguns estudos utilizaram diferentes solutos no controle da germinação de sementes de várias espécies vegetais, tais como NaCl, KCl, KNO₃, manitol e polietileno glicol (GUIMARÃES, 1991; CAMARGO, 1998).

Baseado neste princípio, COUTINHO (2000) conduziu diversos trabalhos com testes de sanidade, visando o controle da germinação, testando os solutos osmóticos como manitol, NaCl e KCl, em diferentes níveis de restrição, com o objetivo de controlar a germinação de sementes de arroz e feijão.

No entanto, é necessário avaliar esta técnica com diferentes sementes de espécies vegetais, bem como sobre diferentes microorganismos. Para rotina em laboratórios, a metodologia deve ser de fácil operação, baixo custo, e retratar resultados confiáveis. Neste sentido, o presente trabalho

¹ Aluna de Graduação em Agronomia. FAEM/UFPel. Caixa Postal 354 CEP 96010-900 Pelotas, RS. Bolsista FAPERGS

² Eng. Agr. Doutorando em Fitossanidade. Depto de Fitossanidade FAEM UFPel. Caixa Postal 354 CEP 96010-900 Pelotas, RS. Bolsista CNPq

³ Aluna de Graduação em Agronomia FAEM/UFPel. Caixa Postal 354 CEP 90010900 Pelotas, RS. Bolsista UFPel

⁴ Eng Agr. PhD. Professor Titular FAEM/UFPel, Deptº Fitossanidade – Campus Universitário, Caixa Postal 354 CEP 96010-900 Pelotas, RS. pierobom@ufpel.tche.br

(Recebido para publicação em 06/09/2002)

objetivou testar a eficiência de solutos osmóticos na inibição de germinação de sementes de milho e trigo, bem como verificar a influência no resultado do teste de sanidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no ano de 2001 no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Foram utilizadas sementes de trigo e milho, obtidas junto a Embrapa Trigo e Embrapa Clima Temperado, referentes à safra 2000/2001. O teste de sanidade em substrato de papel filtro foi conduzido conforme descrito por NEERGAARD (1977): 400 sementes por amostra distribuídas em 16 repetições de 25 sementes; substrato umedecido com água destilada, em três folhas por caixa gerbox (caixa plástica transparente, medindo 11x11x3 cm com tampa); seguido de incubação em câmara de crescimento por sete dias à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas luz (lâmpadas fluorescentes tipo "luz do dia") e 12 horas escuro. Após o período de incubação, as sementes foram individualmente examinadas e identificados os gêneros de fungos, com auxílio de microscópio estereoscópico.

Os tratamentos constaram da embebição do papel com soluções com 5 níveis de potencial hídrico (-0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa) induzidos por 5 solutos osmóticos (manitol, KCl, NaCl, sacarose e PEG8000 - Polietilenoglicol 8000). A quantidade de solutos utilizada para preparação das soluções, em gramas/litro foi determinada através do software SPMM (MICHEL & RADCLIFFE, 1995). A temperatura utilizada no cálculo foi de 25°C. A incubação em substrato papel com congelamento foi feita seguindo a metodologia descrita acima, porém retirando-se as sementes no segundo dia de incubação em 25°C, e incubando-as por 24 horas em temperatura de -20° C no congelador, posteriormente retornado a temperatura de 25°C. O tratamento com 2,4 - D foi realizado com incubação das sementes sobre papel umedecido em solução do herbicida a 0,5%.

Os resultados dos solutos foram comparados visualmente com a testemunha em água. Foram observados os percentuais de sementes germinadas e de incidência de fungos, apresentados em tabela.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme observado na Tabela 1, o percentual de germinação das sementes diminuiu drasticamente com o incremento do nível de restrição hídrica aplicado ao substrato, independente do soluto e semente testada. Em sementes de trigo, a inibição total da germinação em nível menos negativo foi obtido com sacarose (-0,4 MPa). Os demais solutos controlaram a germinação a partir de níveis mais negativos que -0,6 MPa, exceto para o manitol, que levou o percentual de germinação próximo a zero, em níveis igual ou mais negativo que -0,8 MPa. A necessidade de nível mais negativo de restrição com manitol, também foi verificado nas sementes de milho, o qual embora tenha reduzido a germinação, ainda observou-se 5% de sementes germinadas. A restrição com solução osmótica de KCl promoveu maior controle da germinação das sementes de milho, inibindo a germinação em -0,6MPa. O soluto menos eficiente para induzir restrição hídrica e controlar a germinação de sementes de milho foi o

PEG, enquanto que, com sacarose, apenas os níveis acima de -0,8MPa foram eficientes para controlar a germinação, diferentemente do foi observado para sementes de trigo.

Tabela 1 - Valores de germinação (%) de sementes de trigo e milho sob a influência de solutos e níveis de restrição hídrica em teste de sanidade substrato papel de filtro. UFPel, Pelotas, 2001.

TRATAMENTOS	Nível de Restrição (MPa)	Germinação (%)			
		Trigo	Milho		
Sem restrição hídrica	Água	0,0	78,7	82,8	
	2,4-D (0,2%)	0,0	0	47	
	Congelamento	PEG8000	0,0	0	0
		-0,4	-0,4	30,0	30
		-0,6	-0,6	0	19,6
-0,8		-0,8	0	6,4	
Com restrição hídrica	Manitol	-1	-1	0	9,3
		-0,4	-0,4	30,7	31,4
		-0,6	-0,6	13,2	13,6
		-0,8	-0,8	0,2	5,9
	KCl	-1	-1	0,0	4,64
		-0,4	-0,4	19,0	5
		-0,6	-0,6	0	1
		-0,8	-0,8	0	0
	Sacarose	-1	-1	0	0
		-0,4	-0,4	0	23,9
-0,6		-0,6	0	10,7	
-0,8		-0,8	0	2,1	
NaCl	-1	-1	0	0,7	
	-0,4	-0,4	6,0	8,2	
	-0,6	-0,6	1,0	3,9	
	-0,8	-0,8	0	5	
		-1	0	0	

Estes resultados concordam com os estudos conduzidos por BRACCINI et al. (1996) que constataram que potenciais hídricos mais negativos que -0,3 MPa, induzidos por soluções osmóticas de NaCl, manitol e PEG 6000, reduziram a germinação e o vigor das sementes de soja. Quanto à diferença de eficiência entre os solutos, na inibição da germinação, alguns autores atribuem este fato a diferenças de toxidez provocadas pelos solutos, bem como diferenças de potencial hídrico de equilíbrio, que pode variar de acordo com as características das sementes de cada espécie, ou mesmo cultivares e lotes dentro de mesma cultivar (BRADFORD, 1986). A incidência de fungos nos tratamentos com restrição hídrica foi visualmente semelhante aos resultados dos tratamentos sem restrição hídrica, em sementes de trigo, exceto para a restrição com PEG8000, no nível -0,4 MPa, onde observou-se alta incidência de *Trichoderma* sp. (40%), em detrimento dos demais microorganismos e no método de congelamento observou-se uma maior incidência de alguns fungos como *Bipolaris* sp.. LUCCA FILHO (1987), relata que o congelamento pode estimular a incidência de alguns microorganismos, como *Drechslera*, *Fusarium*, *Septoria*, *Phoma* e outros. Níveis mais negativos que -0,4MPa de PEG reduziram drasticamente a incidência do *Trichoderma* sp. e de outros fungos associadas às sementes, conforme observado nas Tabelas 2 e 3.

Em teste de sanidade, COUTINHO (2000) trabalhando com sementes de arroz verificou que a restrição hídrica induzida por NaCl, KCl e manitol, nos potenciais osmóticos de -0,6 a -0,9, é eficiente para inibir ou retardar a germinação das sementes, não interferindo na detecção de fungos. Já

para sementes de feijão, níveis de -0,4 a -0,7, foram suficientes para promover o mesmo efeito, sem interferência no resultado do teste de sanidade. Os autores constataram que os níveis de restrição hídrica testados estavam acima dos

limites críticos necessários ao crescimento dos fungos, sendo a água contida no substrato suficiente para atingir a plena germinação, mesmo em potenciais hídricos mais negativos.

Tabela 2 – Incidência de fungos (%) em sementes de trigo detectados em teste de sanidade de substrato papel (400 sementes) com restrição hídrica e sem restrição hídrica. UFPel, Pelotas, 2001.

TRATAMENTOS		Níveis de restrição (MPa)	Fungos						
			<i>Alternaria</i> sp.	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	
Sem restrição hídrica	Congelamento	0,0	34,70	17,00	5,25	9,50	6,00	0,50	
	2,4 D	0,0	28,00	11,70	7,25	5,50	8,75	0,50	
	Água	0,0	25,20	11,50	4,00	3,00	6,50	0,50	
	Sacarose		0,4	28,50	13,95	6,00	3,00	5,50	0,25
			0,6	28,00	13,70	7,75	7,50	4,25	0,50
			0,8	28,50	13,50	9,25	5,75	5,75	1,00
			1,0	26,70	7,75	7,25	4,50	5,75	1,50
	Manitol		0,4	26,50	14,50	7,00	6,25	5,00	0,00
			0,6	28,20	15,25	8,75	3,25	4,75	0,25
			0,8	20,70	16,25	3,25	3,00	5,50	1,25
			1,0	27,00	17,50	3,25	5,25	5,75	0,00
	Com restrição hídrica	NaCl	0,4	25,70	11,75	5,50	7,25	8,25	0,50
0,6			29,50	14,20	6,00	3,00	6,25	0,50	
0,8			26,50	11,45	4,75	5,75	4,25	0,00	
1,0			29,70	15,50	6,00	5,75	7,50	0,25	
KCl		0,4	25,20	12,25	6,25	4,00	5,25	0,50	
		0,6	26,50	13,70	6,50	2,75	5,50	0,50	
		0,8	29,50	11,00	4,50	4,50	5,25	0,00	
		1,0	26,70	14,50	3,00	6,00	4,75	0,00	
PEG 8000		0,4	13,00	8,75	2,00	0,75	2,75	40,00	
		0,6	17,70	9,95	3,25	3,00	7,50	10,00	
		0,8	12,70	5,45	2,25	2,75	4,75	11,00	
		1,0	13,50	5,45	3,75	3,25	3,25	2,50	

Tabela 3 – Incidência de fungos (%) em sementes de milho detectados em teste de sanidade de substrato papel (400 sementes) com restrição hídrica e sem restrição hídrica. UFPel, Pelotas, 2001.

TRATAMENTOS		Níveis de restrição (MPa)	Fungos				
			<i>Cephalosporium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	
Sem restrição hídrica	Congelamento	0,0	3,61	82,22	32,78	0,00	
	2,4 D	0,0	5,00	42,50	53,89	5,28	
	Água	0,0	5,00	46,67	45,55	3,05	
	Sacarose		0,4	2,50	39,17	47,78	2,78
			0,6	5,55	39,44	38,33	0,83
			0,8	3,89	36,67	46,94	2,50
			1,0	6,67	41,67	53,05	1,10
	Manitol		0,4	3,61	42,50	49,44	2,22
			0,6	4,72	39,44	52,55	2,50
			0,8	3,61	36,67	50,00	1,94
			1,0	4,17	26,94	52,50	2,50
	Com restrição hídrica	NaCl	0,4	5,83	33,33	51,67	0,00
0,6			5,00	45,00	61,67	1,59	
0,8			1,94	31,94	52,78	0,55	
1,0			0,00	32,12	55,28	0,55	
KCl		0,4	8,05	36,39	46,39	0,00	
		0,6	4,72	36,94	50,55	1,67	
		0,8	5,83	33,33	56,39	1,67	
		1,0	7,50	33,33	48,61	0,83	
PEG 8000		0,4	4,72	44,44	50,55	10,00	
		0,6	4,72	40,00	50,83	3,61	
		0,8	3,89	34,72	39,17	1,94	
		1,0	2,50	34,44	37,78	1,39	

No presente trabalho, todos os solutos testados foram eficientes para reduzir a germinação quando comparado com a testemunha em água, a qual foi o controle absoluto, aumentando a eficiência com níveis de restrição mais negativos. Para ser utilizado como rotina, é aconselhável utilizar solutos que sejam de fácil aquisição e baixo custo, e que promovam a inibição ou retardamento da germinação em potenciais hídricos menos negativos, para diminuir a quantidade de soluto requerido na solução. Com os resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que o PEG8000, além de ter custo mais alto, afetou o resultado do teste de sanidade, pois estimulou a incidência de *Trichoderma* spp., em detrimento dos demais microorganismos, no nível menos negativo (-0,4 MPa). Já os demais solutos não interferiram no resultado, sendo que a opção de escolha do soluto deve ser baseada na economicidade do teste, pois sais como KCl e NaCl, necessitam de menor quantidade em gramas, comparado ao manitol e sacarose, para atingir um mesmo potencial hídrico.

Comparado aos métodos tradicionais como o congelamento, a restrição hídrica não mata a semente e dispensa maior operacionalidade. Já o 2,4 - D é um produto carcinogênico e deve ser evitado seu uso em laboratórios, considerando as outras desvantagens anteriormente citadas. Por fim, a técnica apresenta-se como excelente alternativa para uso de rotina em laboratório de análise de sanidade de sementes de trigo e milho, não afetando o resultado do teste e promovendo inibição suficiente da germinação para facilitar a análise sob microscópio.

ABSTRACT

*Water restriction in blotter seed health tests has been used for inhibition of seed germination aiming to avoid seed movement, and the subsequent contamination, and focus differences during microscopic evaluation. Seed lots of wheat and corn were tested under the levels of -0.4; -0.6; -0.8 e -1.0 MPa of water restriction, promoted by the addition of solutions with different concentrations of mannitol, KCl, NaCl, sucrose and PEG8000 (Polyethylene glycol 8000) to blotter paper. The treatment effects on seed germination and fungal incidence were compared with the water, 2,4-D solution and freezing method checks. The presence of sucrose and KCl on the blotter paper inhibited germination of wheat seeds in all tested levels while PEG8000 and NaCl, showed significant inhibition only at -0.6; -0.8 and -1.0 MPa levels. Regarding to the corn seeds, complete germination inhibition was attained only with KCl at -0.8 and -1.0 MPa and NaCl at -1.0 MPa. Fungal incidence level on wheat seeds was similar to the checks at all levels of osmotic solutes except for PEG 8000 at -0.4 MPa which increased the occurrence of *Trichoderma* sp. The treatments applied to corn seeds appeared to have no effect on fungal incidence, which was similar to the water check treatment. Water restriction, specially*

with low cost solutes as NaCl and KCl seems to be an efficient technique to be routinely used in seed health laboratories.

Key words: water restriction, seed health test, fungi, blotter test.

REFERÊNCIAS

- BRACCINI, A. de L.; RUIZ, H. A.; BRACCINI, M. do C. L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietileno glicol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 10-16, 1996.
- BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Hortscience**, v. 21, n. 5, p. 1105-1112, 1986.
- CAMARGO, R. de. **Condicionamento fisiológico de sementes de caféiro (*Coffea arabica* L.)**. Lavras, 1998. 108p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras.
- COUTINHO, W.M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. Lavras, 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras.
- GUIMARÃES, R. M. **Efeito do condicionamento osmótico sobre a germinação e desempenho de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob condições ideais e de estresse térmico, hídrico e salino**. Lavras, 1991. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras.
- LIMONARD, T. Ecological aspects of seed health testing. **Proceeding of International Seed Testing Association**, Wagenigen, v. 33, n. 2, p. 343-513, 1968.
- LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. das S. (Eds.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 126-130, 1995.
- NEERGARD, P. **Seed Pathology**. 2. ed. England, v.1, 1977. 1187p.
- TANAKA, M. A. de S. Recentes avanços no desenvolvimento de métodos de detecção de fungos em sementes, no Brasil. **Informativo Abrates**, v. 11, n. 1, p. 24-31, 2001.