

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES DE AMENDOIM¹

ANTONIO EDILSON DA SILVA ARAÚJO², ANA PAULA GOMES DE CASTRO³, CLAUDIA ANTONIA VIEIRA ROSSETTO⁴

RESUMO – O objetivo foi avaliar o efeito dos procedimentos de incubação e de desinfestação usando hipoclorito de sódio no desenvolvimento de fungos em teste de sanidade de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Foram realizados dois experimentos com dois lotes da cultivar Botutatu. No primeiro experimento, as sementes foram divididas em duas amostras, sendo uma imersa previamente em hipoclorito de sódio. A incubação destas foi realizada em meio agarizado (BDA, CZ) e em folhas de papel (sobre e em rolo), com ou sem restrição hídrica. No segundo experimento, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio a 1, 2, 3 5 e 10%, por um, três, cinco e dez minutos e, posteriormente, foram incubadas em BDA. Os métodos de incubação em meio agarizado com restrição hídrica propiciaram maior recuperação de *Aspergillus* spp e de *Cladosporium* spp. nas sementes de amendoim sem desinfestação prévia. Houve menor ocorrência de *Rhizopus* spp. e *Aspergillus niger* nas sementes desinfestadas, independente do período de embebição e da concentração de hipoclorito de sódio.

Termos para indexação: *Arachis hypogaea* L., hipoclorito de sódio, restrição hídrica, *Aspergillus* spp..

SANITARY QUALITY EVALUATION AND MOLD GROWTH ON PEANUT SEEDS

ABSTRACT – The objective was to evaluate the effect of disinfection using sodium hypochloride and incubation procedures on the mold growth in the health test of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. Two experiments were carried out with two lots of cv. Botutatu. In the first experiment, the seeds were divided into two samples and one was submitted to immersion in sodium hypochloride. The incubation was realized in agar medium (PDA, CZ) and paper towel (blotter test and rolled paper), with or without water restriction. In the second experiment, the seeds were submitted to immersion in sodium hypochloride at 1, 2, 3, 5 and 10%, for one, three, five and ten minutes and they were incubated in PDA. The incubation methods in agar medium with water restriction promoted the highest recovery of *Aspergillus* spp. and *Cladosporium* spp. in the peanut seeds that had not been submitted to previous disinfection. The *Rhizopus* spp. and group *Aspergillus niger* incidence was lower in the disinfected seeds, regardless of the immersion period or sodium hypochlorite concentration.

Index terms: *Arachis hypogaea* L., sodium hypochloride, water restriction, *Aspergillus* spp.

¹ Submetido em 28/10/2003. Aceito para publicação em 20/05/2004

² Eng. Agrônomo, Mestrando em Fitotecnia da UFRRJ. Email: edilson@ufrj.br, Bolsista do CNPq.

³ Graduanda em Agronomia da UFRRJ. Email: ana.castro21@bol.com.br,

Bolsista da FAPERJ.

⁴ Eng. Agrônomo, Dr., Professora do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ, Cx. Postal 74511, Rio de Janeiro, RJ, CEP 23.890-000. Email: cavrosse@ufrj.br. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

Para o estabelecimento da cultura do amendoim é fundamental a avaliação da qualidade sanitária das sementes desta espécie, conjuntamente com a análise da germinação, principalmente quando se constata sementes mortas e plântulas anormais neste teste. Em sementes de amendoim, são frequentemente detectados alguns fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* (Ito et al., 1992) e *Alternaria*, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Dothiorella* e *Pestalotia* (Mariotto et al., 1982). Os fungos de maior incidência são *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp, que tem sido associados às sementes de baixa qualidade fisiológica (Mariotto et al., 1982). Espécies de *Aspergillus* dos grupos *flavus* e *niger* tem causado decréscimo de germinação (Harmon & Pflieger, 1974; McLean et al., 1984) e, assim como *Penicillium* spp., tem promovido lesões nas plântulas, levando ao menor desenvolvimento destas (Backman & Hammond, 1976, Ito et al., 1992). Estes fungos podem contaminar e infectar as sementes de amendoim no campo (Rossetto et al., 2003) e após a colheita (Ito et al., 1992). Em sementes de amendoim, Usberti & Amaral (1999) constataram que para a invasão destes fungos, os teores de água das sementes devem ser maiores que 7% (base úmida).

Para a avaliação da qualidade sanitária, métodos diversos têm sido empregados, visando a detecção de fungos associados às sementes de amendoim. Dentre eles, destaca-se o método do papel de filtro. Segundo Reis et al. (1999), muitos fungos contaminantes crescem rapidamente neste substrato, tais como, *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp., podendo dificultar a identificação e a quantificação de fungos de crescimento lento, de tal forma que a incidência pode ser subestimada. Outro método é o de plaqueamento das sementes em meio de cultura agarizado, tais como, BDA (extrato de batata-dextrose-ágar) e CZ (czapeck) (Ito et al., 1992). Para Lucca Filho (1987), este é utilizado quando as condições de outros métodos, como a incubação em papel de filtro, não são adequadas para o crescimento vegetativo e esporulação de fungos e para a detecção de patógenos que produzem colônias características em meio de cultura. No entanto, este método pode ter sua prática prejudicada na detecção de patógenos, quando ocorre a germinação das sementes, dificultando a identificação dos fungos associados às mesmas (Coutinho et al., 2001).

Para inibir a germinação, quando as sementes são avaliadas pelos métodos de incubação em papel de filtro e em meio de cultura agarizado, tem sido utilizado 2,4-diclorofenoxiacetato de sódio, assim como a técnica da

restrição hídrica, induzida pela adição ao meio de cloreto de sódio, cloreto de potássio ou manitol (Braccini & Dhingra, 1996; Coutinho et al., 2001). Estes solutos interferem na germinação tanto pelo efeito osmótico (Heydecker et al., 1995), quanto pela penetração de níveis tóxicos nas células (Braccini et al., 1996) e inibição da síntese e, ou, das atividades de enzimas hidrolíticas necessárias à germinação das sementes, provocada por concentração elevada de sais (Campos & Assunção, 1990). Além disso, segundo Coutinho et al. (2001), a técnica de restrição hídrica minimiza as contaminações secundárias resultante de crescimento fúngico sobre os nutrientes exsudados das sementes mortas que são drenados pelo papel de filtro. Comparando os métodos de incubação, Ito et al. (1992) mostraram que o meio BDA acrescido de 6% de cloreto de sódio foi o que proporcionou maior recuperação de *Aspergillus* spp. e de *Penicillium* spp. em sementes de amendoim, que não foram previamente tratadas com hipoclorito de sódio, em relação ao método do papel de filtro. Já em sementes de soja, Pereira et al. (1994) detectaram, pelo método de papel de filtro com 2,4 diclorofenoxiacetato de potássio, sem tratamento prévio das sementes, maior recuperação de *Aspergillus* spp. em relação ao método de incubação em meio ágar-salino, com desinfestação prévia das sementes.

Em relação ao tratamento prévio das sementes, tem sido recomendado em testes de sanidade de sementes de amendoim, o uso de hipoclorito de sódio (NaOCl), na concentração de 1%, por três minutos (Brasil, 1992). Este tratamento pode auxiliar na redução da contaminação das sementes (Coutinho et al., 2000; Zorato et al., 2001), facilitando a identificação de microrganismos nos tecidos internos das sementes (Hewett, 1979). Quanto à eliminação de microrganismos na superfície das sementes por este agente desinfestante, esta depende da espécie do fungo, da condição fisiológica da semente, da quantidade de contaminação superficial, do tempo de imersão, do pH, da concentração do desinfetante, do agente químico a ser empregado (Zito et al., 1995; Sauer & Burroughs, 1986). Para Zorato et al. (2001), a partir da concentração de 3% de hipoclorito de sódio por cinco minutos, houve eliminação de *A. flavus* em sementes de soja. No entanto, em sementes de amendoim, o tratamento com hipoclorito propiciou redução da recuperação de *Aspergillus* spp., de *Penicillium* spp. e de *Rhizopus* spp., pelo método de incubação em BDA (Ito et al., 1992) e do papel de filtro (Prete, 1985 e Ito et al., 1992), embora tenha promovido menor ocorrência de *Rhizopus* spp..

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos procedimentos de incubação e de desinfestação

com hipoclorito de sódio no desenvolvimento de fungos em teste de sanidade de sementes de amendoim.

MATERIALE MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Análise de Sementes da UFRRJ com dois lotes de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), cultivar Botutatu. Estes foram produzidos em Seropédica/RJ, no cultivo das águas (safra 2001/02) e no cultivo da seca (safra 2003), padronizados quanto ao tamanho em peneira de crivo oblongo (18/64"), armazenados em sacos de papel em câmara seca ($18 \pm 2^\circ\text{C}$ e $45 \pm 5\%$ de UR do ar) por 150 e 30 dias e, denominados de lote 1 e 2, respectivamente.

No primeiro experimento, visando a avaliação dos métodos de incubação as sementes dos dois lotes foram divididas em duas amostras, sendo uma submetida ao tratamento prévio com hipoclorito de sódio, a 2%, por cinco minutos e, em seguida, a lavagem em água destilada e a secagem sob fluxo laminar por uma hora. Posteriormente, as amostras foram colocadas em diferentes substratos, sendo cinco subamostras de 10 sementes em caixas plásticas tipo gerbox contendo três folhas de germibox, duas subamostras de 25 sementes em rolo de papel germitest e, cinco subamostras de 10 sementes em cada placa de Petri contendo meio agarizado (CZ - czapeck e BDA – batata, dextrose e ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina (0,03%). A estes substratos (meio de cultura agarizado e folhas de papel de filtro) foi adicionado ou não solução de NaCl (6%), visando obter restrição hídrica e impedir a germinação das sementes, conforme descrito em Ito et al. (1992). A incubação foi realizada a 20°C , por cinco dias, sob regime alternado de 12h de luz (fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes de 20W). Posteriormente, foi realizada a identificação e a quantificação dos fungos, com auxílio de microscópio estereoscópico. Quando necessário, foram feitas lâminas e usado o microscópio óptico. Foi determinada a porcentagem de cada fungo (*Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.), com base em Singh (1992) e Silveira (1995). Para a caracterização dos isolados do grupo *A. flavus*, foi empregado o meio diferencial ADM (triptona, extrato de levedura e citrato férrico), conforme Bothast & Fennell (1974). Cada isolado de *Aspergillus* spp. foi repicado para três placas de Petri contendo o referido meio. Após a incubação, a 25°C , por 72 h, sem luz, foi constatado que a presença de pigmentação laranja-amarela no verso da colônia indicou que o isolado pertencia ao grupo *A.*

flavus.

No segundo experimento, visando a avaliação do tratamento prévio com hipoclorito de sódio, amostras de 50 sementes foram imersas em 130ml de hipoclorito de sódio a 1, 2, 3, 5 e 10%, com respectivamente, 0,05, 0,1, 0,15, 0,5 e 1% de cloro ativo, por períodos de um, três, cinco e 10 minutos. Após a imersão, as sementes foram lavadas em água destilada e colocadas para secar sobre papel de filtro, sob fluxo laminar, por uma hora. Em seguida, foram realizados os testes de teor de água e de sanidade. Para o teste de teor de água, quatro subamostras de 15 sementes foram colocadas em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas, de acordo com Brasil (1992). Para o de sanidade, cinco subamostras de 10 sementes foram incubadas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, por cinco dias, sob regime alternado de 12h de luz, em placas de Petri contendo meio BDA, acrescido de sulfato de estreptomicina (0,03%) e de NaCl (6%), com base em Ito et al. (1992). Posteriormente, foi realizada a identificação e a quantificação dos fungos, de acordo com os procedimentos descritos anteriormente.

No primeiro experimento o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (quatro métodos de incubação x dois procedimentos de restrição hídrica), com quatro repetições de 50 sementes. No segundo o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (cinco concentrações de hipoclorito de sódio x quatro períodos de embebição), com três repetições.

A análise de variância foi realizada por lote e amostra (primeiro experimento) e por lote (segundo experimento), sendo que os dados em porcentagem foram transformados previamente em raiz quadrada de $(x+0,5)$. Nas Tabelas encontram-se os dados originais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, quando não foi realizado o tratamento prévio com hipoclorito de sódio, foi verificado que houve efeito significativo da interação entre os métodos de incubação e os procedimentos de restrição hídrica na recuperação dos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* nas sementes do lote 1 e, dos gêneros *Rhizopus* e *Fusarium* nas sementes dos dois lotes (Tabelas 1 e 2). Os métodos de incubação em meio agarizado (BDA e CZ), com restrição hídrica, propiciaram maior recuperação de fungos do grupo *A. glaucus* e dos gêneros *Cladosporium* e *Aspergillus* nas sementes do lote 1, em relação aos sem restrição hídrica (Tabela 1), assim como menor recuperação de *Rhizopus* spp. e de *Fusarium* spp. nas sementes dos dois

TABELA 1. Incidência (%) de fungos em sementes de amendoim, cv. Botutatu, do lote 1, incubadas em BDA, Czapek, papel de filtro, rolo de papel, com (C/R) ou sem (S/R) restrição hídrica, sem desinfestação com hipoclorito de sódio. Seropédica, RJ, 2002/2003.

Tratamentos	<i>Rhizopus</i> spp.			<i>Fusarium</i> spp.			<i>Cladosporium</i> spp.			<i>Penicillium</i> spp.		
	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média
BDA	56,0Ba*	95,0Aa	75,5	1,0Ba	10,0Ac	5,0	8,5Aa	0,5Ba	4,5	43,5Ab	29,0Ab	36,3
Czapek	3,5Bc	62,5Ab	33,0	0,0Ba	22,5Aa	11,3	4,5Aa	0,0Ba	2,8	45,8Ab	41,5Aab	43,6
Papel de filtro	12,5Ac	14,5Ac	13,5	4,0Aa	6,5Ab	5,2	0,5Ab	0,0Aa	0,3	64,5Aa	66,0Aa	65,3
Rolo de papel	20,0Ab	21,0Ac	20,5	0,5Aa	0,5Ac	0,5	0,0Ab	0,5Aa	0,3	82,5Aa	25,5Bb	54,0
Média	20,5	48,3		0,9	7,4		3,4	0,3		59,1	40,5	
C.V.(%)		14,63			37,48			38,48			16,77	
Tratamentos	<i>Aspergillus</i> spp.			grupo <i>Aspergillus flavus</i>			grupo <i>Aspergillus niger</i>			grupo <i>Aspergillus glaucus</i>		
	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média
BDA	91,5Aa	19,0Bb	55,3	25,5Aa	6,5Bb	16,0	4,5Aa	1,5Bb	3,0	81,5Aa	4,5Bb	43,0
Czapek	73,8Aa	62,0Ba	67,9	13,3Bab	4,0Aa	28,6	1,0Ba	1,5Aa	1,2	66,3Aa	13,0Bb	39,0
Papel de filtro	48,5Ab	39,5Ab	44,0	6,5Ab	3,0Ab	9,8	1,0Aa	1,0Ab	1,0	24,5Ab	19,5Aa	22,0
Rolo de papel	59,5Ab	32,5Ab	46,0	19,0Aab	9,5Ab	14,3	0,5Aa	0,5Ab	0,5	34,5Ab	21,5Aa	28,0
Média	68,3	38,3		16,1	18,3		1,7	5,1		68,3	38,3	
C.V.(%)		15,95			26,14			46,18			18,02	

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não deferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

lotes (Tabelas 1 e 2). Os métodos de incubação em folhas de papel, com restrição hídrica, não diferiram dos sem a adição do soluto, na recuperação de fungos dos grupos *A. flavus*, *A. glaucus* e *A. niger* e dos gêneros *Cladosporium* e *Aspergillus* nas sementes do lote 1 (Tabela 1), e na de *Rhizopus* spp. e de *Fusarium* spp. nas sementes dos dois lotes (Tabelas 1 e 2). No entanto, para Coutinho et al. (2001), a técnica de restrição hídrica minimizou as contaminações secundárias resultante, principalmente, de crescimento de *Rhizopus* spp. sobre os nutrientes exsudados das sementes mortas que são drenados pelo papel de filtro.

Quando foi empregada a restrição hídrica, os métodos de incubação em meio agarizado (BDA e CZ) propiciaram menor recuperação de *Penicillium* spp., assim como maior recuperação de fungos do grupo *A. glaucus* e dos gêneros *Cladosporium* e *Aspergillus* nas sementes do lote 1, em relação aos métodos de incubação em folhas de papel (Tabela 1). Nas sementes do lote 2, estes métodos também proporcionaram maior recuperação de *Aspergillus* spp. e de *Cladosporium* spp., porém, independentemente dos procedimentos de restrição hídrica (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Ito et al. (1992), onde o método de plaqueamento em BDA acrescido de 6% de NaCl, sem a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio, foi o que propiciou maior recuperação de *Aspergillus* spp. e de

Penicillium spp., do que o do papel de filtro.

Neste experimento, não houve germinação das sementes nos substratos com restrição hídrica (dados não apresentados), pois a água contida nestes não foi suficiente para que as sementes atingissem a fase III do processo germinativo (Heydecker et al., 1975). Para Barba et al. (2002), a inibição da germinação das sementes induzida pela restrição hídrica do substrato favorece o maior contato desta com o substrato, uma vez que se evita o desenvolvimento da plúmula, estimulando a esporulação do fungo e facilitando a detecção e a quantificação destes.

Comparando a porcentagem de sementes dos dois lotes, contaminadas por fungos (Tabelas 1 e 2), foi constatada maior ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Rhizopus* nas do lote 1, que estavam armazenadas por maior período, embora apresentando 6,5% de água, valor abaixo do considerado favorável ao crescimento de fungos, com base em Usberti & Amaral (1999). Também, Ito et al. (1992) detectaram estes fungos nas sementes desta espécie.

Quando foi realizado o tratamento prévio das sementes, não houve interação entre os métodos de incubação e os procedimentos de restrição hídrica na recuperação dos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Cladosporium* nas sementes dos dois lotes (Tabelas 3 e 4). Assim, nas sementes dos dois lotes, a recuperação de fungos

TABELA 2. Incidência (%) de fungos em sementes de amendoim, cv. Botutatu, do lote 2, incubadas em BDA, Czapek, papel de filtro, rolo de papel, com (C/R) ou sem (S/R) restrição hídrica, sem desinfestação com hipoclorito de sódio. Seropédica, RJ, 2002/2003.

Tratamentos	<i>Rhizopus</i> spp.			<i>Fusarium</i> spp.			<i>Cladosporium</i> spp.		
	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média
BDA	0,00Ba*	10,00Aa	5,00	24,00Ba	41,00Aa	32,50	2,00	3,00	2,50a
Czapek	0,00Ba	9,00Aa	4,50	27,00Ba	47,50Aa	37,25	0,00	1,50	0,75ab
Papel de filtro	0,00Aa	0,50Ab	0,25	15,50Aa	24,50Ab	20,00	0,00	1,00	0,50b
Rolo de papel	2,00Aa	1,50Aab	1,75	17,00Aa	14,00Ab	15,50	0,00	0,00	0,00b
Média	0,50	5,25		20,87	31,75		0,50A	1,38A	
C.V. (%)	53,97			15,87			51,49		
Tratamentos	<i>Penicillium</i> spp.			<i>Aspergillus</i> spp.			grupo <i>Aspergillus flavus</i>		
	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média
BDA	47,50	58,00	52,75ab	0,00	0,50	0,25ab	0,00	0,50	0,25a
Czapek	52,50	71,00	61,75a	0,50	2,50	1,50a	0,50	1,00	0,75a
Papel de filtro	27,00	41,50	34,25b	0,00	0,00	0,00b	0,00	0,00	0,00a
Rolo de papel	38,50	58,50	48,50ab	0,00	0,00	0,00b	0,00	0,00	0,00a
Média	41,37B	57,25A		0,30A	0,75A		0,13A	0,38A	
C.V.(%)	18,97			39,40			34,55		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não deferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

TABELA 3. Incidência (%) de fungos em sementes de amendoim, cv. Botutatu, do lote 1, incubadas em BDA, Czapek, papel de filtro, rolo de papel, com (C/R) ou sem (S/R) restrição hídrica, com desinfestação com hipoclorito de sódio, Seropédica, RJ, 2002/2003.

Tratamentos	<i>Rhizopus</i> spp.			<i>Fusarium</i> spp.			<i>Cladosporium</i> spp.			<i>Penicillium</i> spp.		
	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média
BDA	0,5	5,5	3,0a*	12,5	21,0	16,8a	1,5	1,0	1,3a	0,0	4,0	2,0a
Czapek	2,5	3,0	2,8a	6,5	26,5	16,5a	0,0	0,5	0,3a	1,0	2,5	1,8a
Papel de filtro	0,0	2,5	1,3a	13,5	9,0	11,3a	0,5	0,0	0,3a	1,5	2,0	1,8a
Rolo de papel	4,0	3,0	3,5 ^a	10,5	14,5	12,5a	0,0	0,5	0,3a	1,0	5,0	3,0a
Média	1,8A	3,5A		10,8A	7,8A		0,5A	0,5A		0,9B	3,4A	
C.V.(%)	72,55			27,38			35,80			49,74		
Tratamentos	<i>Aspergillus</i> spp.			grupo <i>Aspergillus flavus</i>			grupo <i>Aspergillus niger</i>			grupo <i>Aspergillus glaucus</i>		
	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média
BDA	14,0	11,0	12,5a	3,5	4,5	4,0a	1,0	1,5	1,3a	14,5	5,0	9,8a
Czapek	9,0	13,5	11,3a	2,0	9,5	5,8a	0,0	1,0	0,5a	8,0	3,5	5,8a
Papel de Filtro	15,0	6,6	10,8a	5,5	4,0	4,8a	1,0	0,0	0,5a	7,5	3,5	5,5a
Rolo de papel	14,0	5,0	9,5a	2,0	1,0	1,5a	4,0	0,5	2,3a	5,2	6,4	5,8a
Média	3,0A	9,8A		3,3A	4,8A		1,5A	1,0A		8,8A	4,6B	
C.V.(%)	37,37			50,08			60,75			33,75		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não deferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

do grupo *A. flavus* e dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Cladosporium* não variou com os procedimentos de restrição hídrica e os métodos de incubação. Além disso, independente do método de incubação, houve menor recuperação de *Penicillium* spp., sob condição de restrição hídrica.

Comparando a porcentagem de sementes dos dois lotes contaminadas por fungos, após terem sido (Tabelas 3 e 4) ou não submetidas ao tratamento prévio (Tabelas 1 e 2), verificou-se que a desinfestação das sementes propiciou menor ocorrência de *Rhizopus* spp., aumentando a recuperação de

TABELA 4. Incidência (%) de fungos em sementes de amendoim, cv, Botutatu, do lote 2, incubadas em BDA, Czapek, papel de filtro, rolo de papel, com (C/R) ou sem (S/R) restrição hídrica, com desinfestação com hipoclorito de sódio, Seropédica, RJ, 2002/2003.

Tratamentos	<i>Rhizopus</i> spp.			<i>Fusarium</i> spp.			<i>Cladosporium</i> spp		
	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média
BDA	0,00	5,00	2,50a*	9,00Bab	33,50Aa	21,25	0,50	0,00	0,25a
Czapek	0,50	0,50	0,50a	17,00Aa	23,00Aab	20,25	0,00	0,50	0,25a
Papel de filtro	0,00	0,00	0,00a	5,50Ab	9,50Ac	7,50	0,00	0,00	0,00a
Rolo de papel	0,00	1,50	0,75a	19,00Aa	11,00Abc	15,00	0,00	0,00	0,00a
Média	0,13A	1,75A		12,75	19,25		0,13A	0,13A	
C.V. (%)		75,43			22,87			28,68	

Tratamentos	<i>Penicillium</i> spp.			<i>Aspergillus</i> spp.			grupo <i>Aspergillus flavus</i>		
	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média	C/R	S/R	Média
BDA	8,00	23,50	15,75ab	3,50	2,00	2,75a	3,00	2,00	2,50a
Czapek	15,00	33,50	24,25a	0,50	0,50	0,50a	0,50	0,50	0,50a
Papel de Filtro	12,00	9,50	10,75b	0,00	0,50	0,25a	0,00	0,00	0,00a
Rolo de papel	20,50	28,50	24,50a	0,00	0,00	0,00a	0,00	0,00	0,00a
Média	13,87B	23,75A		1,00A	0,75A		0,88A	0,63A	
C.V.(%)		26,55			65,41			61,50	

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não deferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade

Fusarium spp. e reduzindo a recuperação principalmente de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Também, Ito et al. (1992) constataram que a desinfestação das sementes de amendoim diminui a ocorrência de *Rhizopus* spp., porém reduz em até 90% a recuperação de *Aspergillus* spp. e de *Penicillium* spp. Assim, visando a detecção e a identificação de patógenos específicos, a decisão do emprego do tratamento prévio das sementes, bem como do método de incubação adequado, torna-se importante na análise da qualidade sanitária.

No segundo experimento, pode-se constatar pelas Tabelas 5 e 6, que houve efeito significativo da interação entre concentração de hipoclorito de sódio e período de embebição somente na ocorrência de *Fusarium* spp. nas sementes do lote 2. Assim, independente do período de embebição, com o emprego de hipoclorito de sódio, a 5 e 10%, com 0,5 e 1,0% de cloro ativo e pH 11,62, foi constatado menor ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente, os do grupo *A. glaucus* nas sementes do lote 1 (Tabela 5), assim como menor ocorrência de *Penicillium* spp. nas sementes do lote 2 (Tabela 6). Além disso, com o emprego destas concentrações, foi constatada eliminação de fungos dos grupos *A. glaucus* e *A. niger* nas sementes do lote 2 (Tabela 5). Para Zorato et al.

(2001), a partir da concentração de 3% de hipoclorito de sódio, com 0,3% de cloro ativo (pH 11,40), por cinco minutos, houve decréscimo mas não eliminação de *A. flavus* em sementes de soja.

A partir de três minutos de imersão, independente da concentração de hipoclorito de sódio, foi verificado menor ocorrência de fungos do grupo *A. flavus* e dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*, nas sementes do lote 1 (Tabela 5) e de *Penicillium* spp. nas sementes do lote 2 (Tabela 6). Além disso, a partir deste período, foi constatada tendência de eliminação de *Cladosporium* spp. nas sementes do lote 2.

Em relação ao *Fusarium* spp., foi verificada maior porcentagem de sementes do lote 1 contaminadas por estes, quando foram empregadas as concentrações de 5 e 10% de hipoclorito de sódio, independente do período de embebição, embora não tenha havido diferença significativa entre as demais concentrações (Tabela 5). Também, foi verificado maior porcentagem de sementes do lote 2 contaminadas por este fungo, quando foram usadas estas concentrações, por um minuto de exposição (Tabela 6). Por estes resultados, pode-se inferir que a menor ocorrência de *Aspergillus* spp., como constatada quando foram usadas estas concentrações de

TABELA 5. Incidência (%) de fungos em sementes de amendoim cv. Botutatu, do lote 1, com desinfestação com hipoclorito de sódio, a 1, 2, 3, 4, 5 e 10%, por 1, 3, 5 e 10 minutos. Seropédica, RJ, 2002/2003.

Tratamentos	<i>Aspergillus flavus</i>					<i>Aspergillus glaucus</i>				
	1	3	5	10	Média	1	3	5	10	Média
1%	10,00	5,00	3,00	4,00	5,25a*	33,00	29,00	17,00	11,00	24,00a
2%	4,00	2,00	0,00	1,00	1,50a	18,00	19,00	15,00	8,00	16,75a
3%	5,00	3,00	4,00	2,00	4,00a	21,00	15,00	13,00	11,00	15,50ab
5%	5,00	1,00	1,00	3,00	2,00a	7,00	11,00	5,00	2,00	7,00c
10%	3,00	2,00	1,00	1,00	1,75a	16,00	14,00	4,00	2,00	9,50bc
Média	5,40A	2,60B	1,80B	2,20B		19,00A	17,60A	10,80B	6,80B	
C.V.(%)	46,20					23,60				
	<i>Aspergillus niger</i>					<i>Aspergillus spp.</i>				
	1	3	5	10	Média	1	3	5	10	Média
1%	2,00	1,00	1,00	1,00	1,25a	45,00	34,00	21,00	17,00	30,25a
2%	3,00	1,00	1,00	1,00	1,50a	25,00	22,00	16,00	10,00	19,75a
3%	2,00	1,00	1,00	0,00	1,25a	27,00	19,00	17,00	13,00	20,00a
5%	1,00	2,00	0,00	1,00	0,75a	13,00	13,00	6,00	6,00	9,50b
10%	1,00	0,00	0,00	0,00	0,25a	20,00	16,00	5,00	3,00	11,50b
Média	1,80A	1,00A	0,60A	0,60A		26,00A	20,80AB	13,00BC	9,80C	
C.V.(%)	53,43					24,74				
	<i>Penicillium spp.</i>					<i>Rhizopus spp.</i>				
	1	3	5	10	Média	1	3	5	10	Média
1%	9,00	3,00	3,00	1,00	4,50a	0,00	1,00	1,00	0,00	0,75a
2%	8,00	3,00	2,00	0,00	3,75a	1,00	0,00	1,00	1,00	0,75a
3%	6,00	0,00	1,00	2,00	2,00a	0,00	1,00	1,00	0,00	0,75a
5%	1,00	1,00	2,00	1,00	1,50a	1,00	0,00	0,00	2,00	0,25a
10%	3,00	3,00	1,00	0,00	2,00a	0,00	2,00	0,00	0,00	0,50a
Média	5,40A	2,00B	1,80B	0,80B		0,40A	0,80A	0,60A	0,60A	
C.V.(%)	47,68					51,29				
	<i>Fusarium spp.</i>					<i>Cladosporium spp.</i>				
	1	3	5	10	Média	1	3	5	10	Média
1%	13,00	10,00	12,00	16,00	11,75a	4,00	1,00	1,00	1,00	1,75a
2%	23,00	5,00	12,00	9,00	13,00a	3,00	3,00	0,00	1,00	1,50a
3%	18,00	13,00	15,00	17,00	15,25a	3,00	2,00	0,00	2,00	1,25a
5%	22,00	19,00	17,00	27,00	18,75a	3,00	1,00	1,00	1,00	1,50a
10%	20,00	12,00	19,00	27,00	17,50a	3,00	2,00	0,00	1,00	1,25a
Média	19,20A	11,80A	15,00A	19,20A		3,20A	1,80AB	0,40B	1,20B	
C.V.(%)	37,11					56,25				

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não deferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade

hipoclorito de sódio, pode ocultar outros patógenos nas sementes, tais como, os do gênero *Fusarium*, que são considerados causadores de redução da germinação de sementes (McLean et al., 1984; Faiad et al., 1997).

Pelas Tabelas 5 e 6, também foi verificado que, nas sementes dos dois lotes, não houve efeito da concentração de

hipoclorito de sódio e do período de embebição na ocorrência de fungos do grupo *A. niger* e do gênero *Rhizopus*, que são frequentes em sementes mortas (Phipps, 1984; Zorato et al., 2001), como também podem causar danos à qualidade fisiológica das sementes (Kabeere & Taligoola, 1983; Novembre & Marcos Filho, 1991).

TABELA 6. Incidência (%) de fungos em sementes de amendoim cv. Botutatu, do lote 2, com desinfestação com hipoclorito de sódio, a 1, 2, 3, 4, 5 e 10%, por 1, 3, 5 e 10 minutos. Seropédica, RJ, 2002/2003.

Tratamentos	<i>Aspergillus flavus</i>					<i>Aspergillus glaucus</i>				
	1	3	5	10	Média	1	3	5	10	Média
1%	10,00	5,00	3,00	4,00	5,25a*	33,00	29,00	17,00	11,00	24,00a
2%	4,00	2,00	0,00	1,00	1,50a	18,00	19,00	15,00	8,00	16,75a
3%	5,00	3,00	4,00	2,00	4,00a	21,00	15,00	13,00	11,00	15,50ab
5%	5,00	1,00	1,00	3,00	2,00a	7,00	11,00	5,00	2,00	7,00c
10%	3,00	2,00	1,00	1,00	1,75a	16,00	14,00	4,00	2,00	9,50bc
Média	5,40A	2,60B	1,80B	2,20B		19,00A	17,60A	10,80B	6,80B	
C.V.(%)	46,20					23,60				
	<i>Aspergillus niger</i>					<i>Aspergillus spp.</i>				
	1	3	5	10	Média	1	3	5	10	Média
1%	2,00	1,00	1,00	1,00	1,25a	45,00	34,00	21,00	17,00	30,25a
2%	3,00	1,00	1,00	1,00	1,50a	25,00	22,00	16,00	10,00	19,75a
3%	2,00	1,00	1,00	0,00	1,25a	27,00	19,00	17,00	13,00	20,00a
5%	1,00	2,00	0,00	1,00	0,75a	13,00	13,00	6,00	6,00	9,50b
10%	1,00	0,00	0,00	0,00	0,25a	20,00	16,00	5,00	3,00	11,50b
Média	1,80A	1,00A	0,60A	0,60A		26,00A	20,80AB	13,00BC	9,80C	
C.V.(%)	53,43					24,74				
	<i>Penicillium spp.</i>					<i>Rhizopus spp.</i>				
	1	3	5	10	Média	1	3	5	10	Média
1%	9,00	3,00	3,00	1,00	4,50a	0,00	1,00	1,00	0,00	0,75a
2%	8,00	3,00	2,00	0,00	3,75a	1,00	0,00	1,00	1,00	0,75a
3%	6,00	0,00	1,00	2,00	2,00a	0,00	1,00	1,00	0,00	0,75a
5%	1,00	1,00	2,00	1,00	1,50a	1,00	0,00	0,00	2,00	0,25a
10%	3,00	3,00	1,00	0,00	2,00a	0,00	2,00	0,00	0,00	0,50a
Média	5,40A	2,00B	1,80B	0,80B		0,40A	0,80A	0,60A	0,60A	
C.V.(%)	47,68					51,29				
	<i>Fusarium spp.</i>					<i>Cladosporium spp.</i>				
	1	3	5	10	Média	1	3	5	10	Média
1%	13,00	10,00	12,00	16,00	11,75a	4,00	1,00	1,00	1,00	1,75a
2%	23,00	5,00	12,00	9,00	13,00a	3,00	3,00	0,00	1,00	1,50a
3%	18,00	13,00	15,00	17,00	15,25a	3,00	2,00	0,00	2,00	1,25a
5%	22,00	19,00	17,00	27,00	18,75a	3,00	1,00	1,00	1,00	1,50a
10%	20,00	12,00	19,00	27,00	17,50a	3,00	2,00	0,00	1,00	1,25a
Média	19,20A	11,80A	15,00A	19,20A		3,20A	1,80AB	0,40B	1,20B	
C.V.(%)	37,11					56,25				

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não deferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade

CONCLUSÕES

Os métodos de incubação em meio agarizado com restrição hídrica propiciam maior recuperação de *Aspergillus* spp. e de *Cladosporium* spp., nas sementes de amendoim sem desinfestação prévia;

Com o emprego do tratamento prévio, há menor

recuperação de *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. e *Aspergillus* spp. e de espécies do grupo *A. flavus*, independente dos procedimentos de incubação e de restrição hídrica;

Há menor ocorrência de *Rhizopus* spp. e *Aspergillus niger* nas sementes desinfestadas, independente do período de embebição e da concentração de hipoclorito de sódio

REFERÊNCIAS

- BACKMAN, P.A; HAMMOND, J.M. Germination losses associated with delayed application of seed treatment fungicides after peanut shelling. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v.60, n.1, p.1-3, 1976.
- BARBA, J.T; REIS, E.M; FORCELINI, C.A. Comparação de métodos para detecção de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de cevada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.4, p.389-394, 2002.
- BOTHAST, R.J.; FENNELL, D.I. A medium of rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. **Mycologia**, Lawrence, v.66, n.3, p.365-369, 1974.
- BRACCINI, A.L.; DHINGRA, O.D. Identificação de fungos em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e pepino (*Cucumis sativus* L.) por diferentes métodos de detecção. **Revista Unimar**, Marília, v.18, n.3, p. 495-503, 1996.
- BRACCINI, A.L.; RUIZ, H.A; BRACCINI, M.C.L; REIS, M.S. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por solução de cloreto de sódio, manitol e polietilenoglicol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.18, n.1, p.10-16, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CAMPOS, L.S; ASSUNÇÃO, M.V. Estresse salino e hídrico na germinação e vigor de sementes de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.6, p.857-862, 1990.
- COUTINHO, W.M.; PEREIRA, L.A.A; MACHADO, J.C; FREITAS-SILVA, O; PENA, R.C.M.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.3, p.552-555, 2000.
- COUTINHO, W.M.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; FERRERIRA, D.F. Uso da restrição hídrica na embebição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.127-135, 2001.
- FAIAD, M.G.R.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R.D.; PADILHA, L.S. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillet. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.1, p.14-17, 1997.
- HARMON, G.G; PFLEGER, F.L. Pathogenicity and infection sites of *Aspergillus* species in stored seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.64, n.10, p.1339-1344, 1974.
- HEWETT, P.D. Pretreatment in seed health testing. 2. Duration of hypochlorite pre-treatment in the agar plate test for *Ascochyta* spp. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.7, n.1, p.83-85, 1979.
- HEYDECKER, W; HIGGINS, J; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, Zürich, v.3, n.3/4, p.881-888, 1975.
- ITO, M.F; BACCHI, L.M.A; MARINGONI, A.C; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos para detecção de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 18, n. 3, p. 262-268, 1992.
- KABEERE, F; TALIGOOOLA, H.K. Microflora and deterioration of soybean seeds in Uganda. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.11, n.2, p.381-392, 1983.
- LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.276-298.
- MARIOTTO, P.R; SILVEIRA NETO, A.V.P; FIGUEIREDO, P; OLIVEIRA P.A; ARAÚJO, J.B.M. Efeito do tratamento de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) com fungicidas. **O Biológico**, Campinas, v.48, n.3, p.56-60, 1982.
- McLEAN, M.; DINI, M; BERJAK, K. Contribution to the characterization of the seed storage fungi: *Aspergillus vesicolor* and *Aspergillus wentii*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.12, n.2, p.437-446, 1984.
- NOVEMBRE, A.D.L.C.; MARCOS FILHO, J. Tratamento com fungicida e conservação de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.13, n.2, p.105-113, 1991.
- PEREIRA, G.F.A.; MACHADO, J.C.; SILVA, R.L.X.; OLIVEIRA, S.M.A. Fungos de armazenamento em lotes de sementes de soja descartados no estado de Minas Gerais na safra 1989/90. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.2, p. 216-219, 1994.
- PHIPPS, P.M. Soybean and peanut seed treatment: new developments and needs. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, n.1, p.76-77, 1984.
- PRETE, C. E.C. **Escolha manual, seleção eletrônica pela cor, tratamento fungicida e qualidade de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 1985. 73f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.
- REIS, E.M.; REIS, A.C; CASA, R.T; BLUM, M.M.C. Comparison of methods to detect leaf and head blighting fungi in small grain seeds. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.25, n.4, p.364-367, 1999.
- ROSSETTO, C.A.V.; LIMA, T.M.; VIEGAS, E.C.; SILVA, F.O.; BITTENCOURT, A.M. Efeito da calagem, da colheita e da secagem na qualidade sanitária de amendoim na seca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.5, p. 567-573, 2003.
- SAUER, D.B; BURROUGHS, Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. **Phytopathology**, Saint Paul, v.76, n.7, p.745-749, 1986.
- SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Âmbito Cultural, 1995. 336p.
- SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; MATHUR, S.B. **An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia, and their mycotoxins**. Hellerup: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1992. 133p.
- USBERTI, R.; AMARAL, H.M. Fungicide dressing timing, seed size, seed origin and fungal incidence effects on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) storability **Seed Science and Technology**, Zürich, v.24, n.2, p.699-706, 1999.

ZITO, R.K; SEDIYAMA, C. S; SEDIYAMA,T; GOMES, J.L.L; ROCHA, V.S. Hipoclorito de sódio e álcool na esterilização superficial de sementes de soja. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.244, p.637-643, 1995.

ZORATO, M.F.; HOMECHIN, M.; HENNING, A.A. Efeito da assepsia superficial com diferentes agentes químicos na incidência de microorganismos em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23 n.1 p. 159-166, 2001.

