

# COMPORTAMENTO DE FUNGOS E DE SEMENTES DE FEIJOEIRO DURANTE O TESTE DE ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL<sup>1</sup>

MONALISA ALVES DINIZ DA SILVA<sup>2</sup> e WALTER RODRIGUES DA SILVA<sup>3</sup>

**RESUMO** - O teste de envelhecimento artificial, recomendado para avaliar o vigor de lotes de sementes, apresenta variabilidade em seus resultados; a ação dos fungos é considerada uma das causas dessa variabilidade. Este trabalho objetivou verificar os efeitos de diferentes períodos de envelhecimento artificial, no comportamento fisiológico de sementes de feijoeiro e dos fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*, inoculados artificialmente. Foram conduzidos testes de sanidade, germinação, tetrazólio, emergência, condutividade elétrica e lixiviação de potássio. As respostas obtidas, dependentes da duração do período de envelhecimento, indicaram efeitos da espécie fúngica presente. Concluiu-se que o teste de envelhecimento artificial associa a expressão de causas fisiológicas e sanitárias, o que prejudica a interpretação dos dados obtidos; a presença de fungos, principalmente de *Aspergillus* spp., pode ser considerada como capaz de interferir de modo negativo no desempenho das sementes envelhecidas artificialmente.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, sanidade, qualidade fisiológica, germinação.

## BEHAVIOR OF FUNGI AND OF BEAN SEEDS DURING THE ARTIFICIAL AGING TEST

**ABSTRACT** - Although recommended for evaluation of seed lot vigor, artificial aging test shows results variability for reasons yet to be elucidated. Seed-fungi association is considered one of the causes responsible for such variation. The goal of this work was to verify the effects of periods of artificial aging on bean seed behavior and on *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum lindemuthianum* fungi artificially inoculated by contact method. Health, germination, tetrazolium, emergence, electrical conductivity and potassium leaching tests were performed for seed behavior evaluation. The answers achieved, besides dependable on the aging time period, indicated the effect of fungi species associated to the seed. The artificial aging test was found to be associated with the expression of physiological and sanitary causes that interfere with data interpretation; the presence of fungi, mainly *Aspergillus* spp., may be considered capable of interfering in the behavior of artificially aged seeds in a negative way.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, health test, physiological quality, germination.

## INTRODUÇÃO

O teste de envelhecimento artificial tem sido considerado eficiente para avaliar o vigor de lotes de

sementes; ao mesmo tempo em que identifica pequenas diferenças de vigor, pode estimar o potencial de conservação da semente. A sua condução, sob condições de elevadas temperaturas e umidade relativa do ar, ocasiona a deterioração das sementes e favorece o aparecimento, na germinação subsequente, de anormalidades ou morte (McDonald et al., 1993).

As perdas na germinação e no vigor, medidas através do teste de tetrazólio em sementes de feijão, soja e amendoim envelhecidas artificialmente, correlacionaram-se com o aumento da lixiviação eletrolítica (Parrish & Leopold, 1978; Pearce & Abdel Samad, 1980). Este aumento, da lixiviação de solutos nas sementes envelhecidas, tem sido relatado como

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 21 de junho de 1999.

Extraído da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor à ESALQ/USP.

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal-FAEF, Rua Carlos Gomes, 556, Bairro Williams, CEP 17400-000 Garça, SP. E-mail: monalisa@fcav.unesp.br

<sup>3</sup> Eng. Agrôn., Dr., Dep. de Produção Vegetal, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), Caixa Postal 09, CEP 13418-970 Piracicaba, SP.

decorrente da deterioração das membranas celulares (Ching & Schoolcraft, 1968; Ching, 1972). Mullet & Considine (1980), trabalhando com ervilha e feijão, observaram que a concentração de  $K^+$  foi alterada com a duração dos períodos de embebição e de envelhecimento das sementes. Quando o período de envelhecimento aumentou, a habilidade das membranas de restabelecerem a semipermeabilidade ficou reduzida, havendo maiores perdas de  $K^+$  durante os estágios iniciais de embebição.

Com o objetivo de determinar, indiretamente, as condições sanitárias das sementes, Menten (1978) procurou correlacionar testes de vigor e de germinação com a incidência de microrganismos em sementes de feijão; observou relação inversa entre a incidência de microrganismos e os resultados dos testes fisiológicos. Marcos Filho (1994) ressaltou que temperatura e umidade elevadas podem inibir a manifestação de alguns microrganismos; assim, os dados obtidos no teste de envelhecimento podem ser superiores aos observados no teste de germinação com as mesmas amostras. Portanto, as condições impostas pelo teste de envelhecimento artificial não agiriam apenas no comportamento das sementes, mas também influenciariam na ação de microrganismos participantes da deterioração. A peroxidação de lipídios em sementes envelhecidas de soja e ervilha, ao provocar maior liberação de aldeídos voláteis, estimulou a germinação de esporos de fungos presentes durante a germinação das sementes (Harman et al., 1982).

Ao observar aumento na taxa de germinação em sementes tratadas com fungicidas e submetidas ao teste de envelhecimento artificial, Sinclair, citado por Menten (1978), considerou que o vigor da semente estaria associado, primordialmente, à ação de microrganismos. Foi constatado que o tratamento fungicida elevou a germinação em sementes de soja infectadas com *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus niger* e submetidas ao envelhecimento artificial (McDonald et al., 1993), o que confirma as observações de Sinclair, citado por Menten (1978). Da mesma forma, Furlan (1986) observou que a presença de *Fusarium* spp. contribuiu na redução da qualidade fisiológica de sementes de feijão postas a envelhecer artificialmente.

Assim, apesar das evidências da ação dos fungos na avaliação do vigor das sementes, especialmente no teste de envelhecimento artificial, os métodos recomendados não estimam a participação relativa dos microrganismos nos resultados obtidos para o desempenho fisiológico (McDonald et al., 1993).

Este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento de fungos e de sementes de feijoeiro durante o teste de envelhecimento artificial.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos quatro experimentos com sementes de feijoeiro, previamente avaliadas por meio de determinação de sanidade. Os três primeiros experimentos consistiram, cada um, dos seguintes pré-tratamentos:

a) Assepsia: as sementes foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,02% por três minutos, lavadas com água destilada e, posteriormente, postas para secar em papel toalha por duas horas.

b) Assepsia + BDA: após desinfecção superficial, as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 15 g de ágar, 20 g de dextrose, 1.000 mL de água destilada) isento de fungos, onde permaneceram por 48 horas em câmara de incubação sob  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e luz alternada em ciclos de 12 horas de luz branca fluorescente/12 horas de escuro (Menten, 1988).

c) Assepsia + BDA + fungo: inoculação artificial com os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium oxysporum*, respectivamente, nos experimentos 1, 2 e 3. Primeiramente, foi obtida a cultura pura do fungo, em tubos de ensaio, com posterior desenvolvimento em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Quando o material repicado do fungo se desenvolveu na superfície do meio de cultura BDA, nova repicagem foi feita para as placas onde se deu a inoculação artificial pelo método de contato. Este consistiu em colocar 60 sementes previamente desinfetadas superficialmente em cada placa de Petri, num procedimento semelhante ao realizado por Tanaka et al. (1989) com algodão; para que houvesse adesão do inóculo à superfície das sementes, as placas foram agitadas manualmente. O período de incubação foi de 48 horas sob  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e luz alternada em ciclos de 12 horas de luz branca fluorescente/12 horas de escuro (Menten, 1988).

O quarto experimento consistiu de assepsia + meio de cultura de vagem de feijão + fungo. O meio de cultura de vagem (200 g de vagem, 16 g de ágar, 20 g de dextrose, 1.000 mL de água destilada) foi utilizado para a inoculação

artificial, pelo método de contato, do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Primeiramente, para a preparação deste meio, vagens de feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.), próprias para o consumo *in natura*, foram batidas com água destilada em liquidificador, cozidas em banho-maria por 30 minutos e, depois, filtradas; o extrato foi misturado com ágar e dextrose, para se proceder à autoclavagem por 40 minutos. O período de incubação, de 48 horas, foi conduzido à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e sob luz alternada em ciclos de 12 horas de luz ultravioleta/12 horas de escuro (Menten, 1988).

Em todos os pré-tratamentos, com exceção do de assepsia exclusiva, o período de incubação foi seguido por secagem ( $30^\circ\text{C}$  em estufa com circulação de ar) até que as sementes, inicialmente com teores de água entre 38,2% e 43,4%, atingissem valores de 11% a 13%.

Os tratamentos foram obtidos pela submissão das sementes, dos quatro experimentos, ao envelhecimento artificial em câmara a  $42^\circ\text{C}$  e 100% de U.R., por períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas. As sementes foram dispostas em minicâmaras (gerbox adaptado) com 40 mL de água destilada em seu interior.

Ao término dos períodos de envelhecimento e antes da realização das determinações, procedeu-se à secagem das sementes em estufa com circulação de ar, à temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , objetivando padronizar o teor de água e, dessa forma, atenuar o efeito dessa variável física na interpretação dos dados. O teste de germinação foi conduzido também com sementes não submetidas à secagem.

A avaliação do estado sanitário das sementes foi feita pelo método do papel de filtro (Neergaard, 1979) sem congelamento *blotter test*, a  $20^\circ\text{C}$ , sob 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro; a semeadura foi efetuada sobre quatro folhas de papel de filtro umedecidas em água destilada. Foram avaliadas 50 sementes por repetição; após sete dias de incubação, foram verificadas a identidade e a frequência, de cada microrganismo encontrado, com o auxílio de microscópio estereoscópico ou composto.

A germinação foi realizada com 50 sementes por repetição, sob temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , utilizando substrato de papel toalha-Germitest, em forma de rolo, umedecido na proporção de duas vezes e meia o peso do papel em volume de água. As contagens, feitas aos quatro e sete dias após a semeadura, computaram a porcentagem final de plântulas normais, conforme os procedimentos descritos em Brasil (1992).

A viabilidade das sementes foi determinada por meio do teste de tetrazólio, com o emprego de 25 sementes/repetição pré-condicionadas, em papel toalha, umedecido por 16 horas, em germinador sob temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Após o pré-condicionamento, as sementes foram imersas

em solução de tetrazólio (0,075%), sob temperatura de  $41^\circ\text{C}$ , por três horas, em estufa sem iluminação interna. Vencido o prazo, as sementes foram retiradas do ambiente aquecido, e em seguida, lavadas com água e mantidas submersas em água refrigerada ( $10^\circ\text{C}$ ) até o momento da avaliação, que, por sua vez, considerou os critérios de viabilidade estabelecidos por França Neto et al. (1988).

O teste de emergência das plântulas constou da semeadura de 50 sementes por repetição, em campo mantido sob irrigação, em linhas de 2,0 m espaçadas de 0,3 m entre si. A avaliação, realizada aos 21 dias após a semeadura, computou a porcentagem de plântulas emersas, em método semelhante ao adotado por Nakagawa (1994).

A condutividade elétrica foi conduzida com a utilização de 25 sementes por repetição. Após a pesagem, as sementes foram imersas em 75 mL de água destilada para permanência em germinador, durante 24 horas, à temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . Ao término do período, a condutividade elétrica da solução foi determinada em condutivímetro; os valores obtidos foram expressos em  $\mu\text{mhos/cm/g}$  de sementes (Marcos Filho et al., 1987).

Para a avaliação da lixiviação de potássio, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Amorim (1978) e adaptada por Marcos Filho et al. (1982, 1984). Foram utilizadas 25 sementes por repetição, que, após pesagem em balança de precisão 0,01 g, foram colocadas em copos de plástico com 75 mL de água destilada, durante 90 minutos, em germinador a  $30^\circ\text{C}$ . A agitação da água foi feita no início e no final deste período; em seguida, foi realizada a determinação em fotômetro de chama. Os dados foram expressos em ppm de K por grama de sementes.

Foi adotado delineamento experimental inteiramente ao acaso, com quatro repetições. A análise de variância foi conduzida isoladamente em cada experimento. A comparação de médias foi efetuada, quando necessário, empregando o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise sanitária

A análise sanitária das sementes, antes da aplicação dos pré-tratamentos e dos tratamentos, revelou uma incidência de 11% e 2%, respectivamente de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Os dados referentes à análise sanitária das sementes (Tabela 1) revelaram que a assepsia não foi eficiente na eliminação de *Aspergillus* spp., e sua incidência aumentou com o período de envelhecimento, em todos os experimentos, principalmente quando o BDA e o meio de vagem foram empregados. No caso do *Penicillium*

spp., também não eliminado pela assepsia, a população tendeu à redução com as ampliações do período de envelhecimento e da população de *Aspergillus* spp.

O crescimento da incidência de *Aspergillus* spp. com o aumento do período de envelhecimento manteve-se evidente mesmo quando os demais fungos foram inoculados. Apenas a presença de *Fusarium oxysporum* conseguiu impedir que a população de *Aspergillus* spp. atingisse 100% de incidência em 96 horas de envelhecimento.

Tais fatos, além de confirmar que as condições de envelhecimento artificial favorecem o desenvolvimento de microrganismos, destacam a tendência de domínio do *Aspergillus* spp. sobre os demais fungos presentes. Por outro lado, além de ficar demonstrada

a falibilidade do método de assepsia (Lima et al., 1982), o estudo dos efeitos fisiológicos do envelhecimento das sementes ficou prejudicado pelo comportamento do *Aspergillus* spp.

O método de inoculação, quando considerados os experimentos 1, 2 e 3, mostrou-se eficiente ao proporcionar a contaminação prevista em todas as sementes. Por outro lado, a inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* (experimento 4), além de contaminar um reduzido número de sementes, não foi adequada a partir de 48 horas, de envelhecimento, uma vez que a presença do microrganismo não foi mais detectada; dessa forma, os dados obtidos deixaram de ser apresentados.

No experimento 1, a ampliação do período de envelhecimento proporcionou, em assepsia e em

**TABELA 1. Porcentagem de fungos associados à semente de feijoeiro após a aplicação dos pré-tratamentos e do envelhecimento artificial em diferentes períodos.**

Experimento	Pré-tratamento	Fungo	Períodos (h) de envelhecimento artificial				
			0	24	48	72	96
1	Assepsia	<i>Aspergillus</i> spp.	14,0	21,0	20,0	28,5	79,5
		<i>Penicillium</i> spp.	4,0	8,5	5,0	11,0	1,0
	Assepsia + BDA	<i>Aspergillus</i> spp.	75,5	72,0	80,0	99,5	100,0
		<i>Penicillium</i> spp.	7,0	8,0	1,0	0,0	0,0
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	Assepsia	<i>Aspergillus</i> spp.	25,0	17,0	14,5	21,0	100,0
		<i>Penicillium</i> spp.	5,0	3,5	5,0	6,5	0,0
	Assepsia + BDA	<i>Aspergillus</i> spp.	8,5	6,5	8,0	18,0	99,0
		<i>Penicillium</i> spp.	7,5	9,5	4,5	4,5	0,5
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	1,0	4,0	10,5	72,0	100,0
		<i>Penicillium</i> spp.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3	Assepsia	<i>Aspergillus</i> spp.	7,0	7,5	6,5	8,0	94,0
		<i>Penicillium</i> spp.	1,0	4,5	3,0	2,0	0,5
	Assepsia + BDA	<i>Aspergillus</i> spp.	10,0	16,0	21,5	71,5	86,0
		<i>Penicillium</i> spp.	9,0	10,0	8,0	3,0	1,0
	Assepsia + BDA + <i>F. oxysporum</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	1,0	3,0	2,5	9,5	58,0
		<i>F. oxysporum</i>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4	Assepsia	<i>Aspergillus</i> spp.	9,0	3,0	6,0	35,0	87,0
		<i>Penicillium</i> spp.	2,0	6,0	7,5	4,0	0,0
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>C. lindemuthianum</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	9,5	14,5	22,0	52,5	100,0
	<i>Penicillium</i> spp.		13,0	9,0	7,5	5,0	2,5
		<i>C. lindemuthianum</i>	4,0	0,5	0,0	0,0	0,0

assepsia + BDA, elevação da ocorrência de *Aspergillus* spp. nas sementes. Em assepsia + BDA + *Aspergillus* spp., a ocorrência de 100% do fungo foi mantida em todos os períodos, similarmente ao verificado no experimento 3 no que tange ao *Fusarium oxysporum*. No caso da inoculação com *Penicillium* spp. (experimento 2), a população do microrganismo decresceu à medida que o período de envelhecimento foi sendo prolongado.

A técnica de assepsia não pôde ser avaliada em relação aos fungos de campo *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*, porque estavam ausentes originalmente, mas ficou evidente sua inadequação para eliminação dos fungos de armazenamento, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. A ampliação do período de envelhecimento, ao mesmo tempo que favoreceu a estabilidade dos fungos *Aspergillus* spp. e *Fusarium oxysporum* ou elevação da população de *Aspergillus* spp., mostrou-se como fator adverso ao desenvolvimento de *Penicillium* spp. e de *Colletotrichum lindemuthianum*.

### Germinação

O teste de germinação, conduzido sem secagem (Tabela 2) e com secagem (Tabela 3), após o teste de envelhecimento artificial, permitiu identificar efeitos interativos entre os pré-tratamentos e os tratamen-

tos utilizados. De modo geral, em todos os experimentos, o aumento na incidência de *Aspergillus* spp. e o período de envelhecimento atuaram na redução progressiva da germinação.

Nos experimentos 1 (*Aspergillus* spp.) e 2 (*Penicillium* spp.), a germinação, independentemente da secagem, foi negativamente afetada pela elevação da ocorrência dos fungos (Tabela 1). Apesar de a inclusão do BDA haver promovido o crescimento populacional dos microrganismos, pareceu atenuar, no experimento 1, a partir de 24 horas e no experimento 2, a partir de 48 horas, o efeito causado pela associação dos fungos com os períodos de envelhecimento sobre a germinação nos demais experimentos.

No experimento 3, a ausência de *Fusarium oxysporum* (Tabela 1), nos pré-tratamentos de assepsia e assepsia + BDA, permitiu identificar a ação negativa de *Aspergillus* spp. e do período de envelhecimento, nas germinações conduzidas sem (Tabela 2) e com secagem prévia (Tabela 3). O uso do BDA confirmou a ação positiva desse meio de cultura sobre a germinação, a partir de 48 horas, em relação à assepsia exclusiva. A aparente ação negativa do *Fusarium oxysporum* na germinação foi, na maior parte dos períodos de envelhecimento, expressa pela inferioridade da assepsia + BDA + *Fusarium oxysporum* em relação à assepsia + BDA, que,

**TABELA 2.** Porcentagem de plântulas normais obtidas no teste de germinação de sementes de feijoeiro após a aplicação dos pré-tratamentos e do envelhecimento artificial em diferentes períodos<sup>1</sup>.

Experimento	Pré-tratamento	Períodos (h) de envelhecimento artificial				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	93,9aA	81,5bB	59,0cB	34,9dB	5,7eB
	Assepsia + BDA	87,2aA	91,8aA	84,0aA	67,2bA	27,4cA
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	91,9aA	25,4bC	6,1cC	0,5dC	0,0dC
2	Assepsia	90,6aA	84,2aA	68,7bB	40,5cB	10,1dC
	Assepsia + BDA	81,3abA	90,7aA	81,8abA	72,1bcA	56,6cA
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	56,0aB	50,5aB	42,9aC	48,0aB	21,3bB
3	Assepsia	88,3aA	83,6aA	62,0bB	48,5bB	20,4cB
	Assepsia + BDA	89,8aA	90,8aA	73,2bcA	77,6bA	61,6cA
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	75,8aB	71,6aB	66,7aAB	45,0bB	28,7cB

<sup>1</sup> Em cada experimento, médias seguidas por mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

conforme a Tabela 1, não apresentou incidência do fungo.

A técnica de aplicação de meios de cultura, para a inoculação de fungos nas sementes, demanda a existência de hidratação seguida por secagem sob baixa temperatura. Esta similaridade, com métodos de pré-condicionamento fisiológico (Heydecker et al., 1975; Tilden & West, 1985; Pandey, 1988), pode explicar os resultados do presente trabalho, que sugeriram efeitos dos meios de cultura na atenuação dos prejuízos fisiológicos provenientes da ampliação do período de envelhecimento artificial; segundo Pandey (1989), os efeitos deletérios do envelhecimento artificial podem ser anulados, pelo pré-condicionamento, em decorrência da recuperação qualitativa das sementes.

Além do teor de água e do período de envelhecimento, o grau de contaminação inicial (anterior ao envelhecimento), é fator que pode determinar a perda de viabilidade das sementes. Nas sementes infectadas com *Aspergillus* spp., o fungo se desenvolveu extensivamente, pelo tegumento, com o surgimento de estruturas de resistência nos períodos de 72 e 96 horas de envelhecimento. É possível que o avançado estágio de deterioração, determinado pela elevada intensidade da inoculação do fungo, tenha promovido a morte das sementes. McDonald et al. (1993) verificaram diferenças signifi-

ficativas na germinação de sementes de soja contaminadas, em diferentes níveis, com *Aspergillus niger*; após envelhecimento artificial por 64 horas, a elevação da contaminação correspondeu à redução na germinação.

No experimento 2 (*Penicillium* spp.), apareceu uma coloração vermelha nos tegumentos e na região de contato dos tegumentos com o papel de germinação, o que sugere uma associação entre a presença do fungo e a substância promotora da coloração.

### Viabilidade

Os dados do teste de tetrazólio (Tabela 4) mostram que os prejuízos fisiológicos relacionados à elevação do período de envelhecimento apresentaram a mesma tendência que no teste de germinação (Tabelas 2 e 3).

Nos experimentos 2 (*Penicillium* spp.) e 3 (*Fusarium oxysporum*), a comparação entre os pré-tratamentos de assepsia + BDA e de assepsia + BDA + fungo não sugeriu, como o esperado (Tanaka & Corrêa, 1981; Furlan, 1986), ação negativa da presença dos fungos na viabilidade (Tabela 4). Por outro lado, no experimento 1 (*Aspergillus* spp.), apesar da constatação do crescimento populacional do microrganismo com a ampliação do período de envelhecimento em todos os pré-tratamentos, as

**TABELA 3. Porcentagem de plântulas normais obtidas no teste de germinação de sementes de feijoeiro após a aplicação dos pré-tratamentos, do envelhecimento artificial em diferentes períodos e de secagem<sup>1</sup>.**

Experimento	Pré-tratamento	Períodos (h) de envelhecimento artificial				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	94,6aA	78,6bB	50,0cB	16,6dB	11,0dB
	Assepsia + BDA	84,1aB	86,7aA	63,0bA	50,5cA	18,7dA
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	89,3aB	25,9bC	4,7cC	0,0dC	0,0dC
2	Assepsia	94,9aA	80,0bA	67,1cB	33,2dB	9,5eB
	Assepsia + BDA	94,8aA	81,5bA	78,6bA	62,6cA	50,5cA
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	47,5aB	34,4bB	16,3cC	16,9cC	5,9dB
3	Assepsia	91,7aA	78,8bA	47,0cB	28,3dC	16,3eC
	Assepsia + BDA	92,2aA	79,2bA	72,7bcA	64,7cdA	54,0dA
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	70,2abB	73,0aA	59,0bcB	45,5cB	29,9dB

<sup>1</sup> Em cada experimento, médias seguidas por mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

**TABELA 4.** Porcentagem de sementes viáveis obtidas no teste de tetrazólio em sementes de feijoeiro após a aplicação dos pré-tratamentos, do envelhecimento artificial em diferentes períodos e de secagem<sup>1</sup>.

Experimento	Pré-tratamento	Períodos (h) de envelhecimento artificial				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	84,5aA	71,1abB	64,1bcB	60,0bcB	53,0cB
	Assepsia + BDA	89,2abA	91,1aA	94,1aA	89,2abA	77,1bA
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	91,1aA	43,0bC	39,8bC	18,4cC	1,0dC
2	Assepsia	93,4aA	76,2bB	67,0bcB	51,0cB	50,0cB
	Assepsia + BDA	95,6aA	89,2abA	85,1abA	86,5abA	79,2bA
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	92,2abA	93,9aA	85,1abcA	81,2bcA	74,3cA
3	Assepsia	94,2aA	76,5bA	67,1bcB	62,3bcB	56,0cB
	Assepsia + BDA	89,0aAB	83,1abA	75,1bcAB	78,3abcA	69,1cAB
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	85,4aB	84,4abA	85,4aA	78,0abA	71,1bA

<sup>1</sup> Em cada experimento, médias seguidas por mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

diferenças de incidência do fungo, entre assepsia e assepsia + BDA + *Aspergillus* spp., indicaram associação entre a elevação populacional do fungo e a redução da viabilidade (Tabelas 1 e 4).

Considerando todos os experimentos, a comparação entre assepsia e assepsia + meio de cultura indica, na maior parte dos casos, efeitos favoráveis do meio de cultura na viabilidade, o que confirma o observado nos testes de germinação. Levando em conta que o teste de tetrazólio é conduzido a partir da avaliação de tecidos do embrião, o fato pode indicar, apesar da inexistência de relatos específicos na literatura, ação histológica reparadora do método de aplicação do meio de cultura.

### Emergência das plântulas

De modo geral, em todos os experimentos, o aumento da população de *Aspergillus* spp. e do período de envelhecimento reduziu o desempenho das sementes (Tabelas 1 e 5). A interferência positiva do BDA no sentido de atenuar esse efeito, verificada nos testes de germinação e de tetrazólio, foi observada exclusivamente no experimento 2 (*Penicillium* spp.).

A atuação negativa dos fungos na qualidade das sementes, detectada pela maioria dos testes fisiológicos realizados, ficou expressa, com clareza, na

emergência das plântulas do experimento 1 (*Aspergillus* spp.) e, moderadamente, na do experimento 2 (*Penicillium* spp.). No caso do experimento 3, contrariamente ao esperado, a presença do *Fusarium oxysporum* elevou o desempenho em algumas das situações de envelhecimento.

### Condutividade elétrica e lixiviação de potássio

Os testes de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio (Tabelas 6 e 7), empregados com a finalidade de estimar a integridade das membranas celulares, indicaram, com algumas exceções, as tendências observadas nos demais testes fisiológicos. Em todos os experimentos, o progresso da deterioração, indicado pela elevação no valor dos dados, aconteceu à medida que o período de envelhecimento era prolongado, e, conseqüentemente, a incidência de *Aspergillus* spp. era ampliada (Tabelas 1). A presença de *Penicillium* spp. e de *Fusarium oxysporum* não ficou associada à deterioração histológica.

Lin (1990), trabalhando com sementes de feijão envelhecidas artificialmente, observou relações diretas entre o aumento do período de envelhecimento e a quantidade de exsudatos da semente na água de embebição; atribuiu ao envelhecimento algumas mudanças nas membranas que, possivel-

**TABELA 5. Porcentagem de emergência de plântulas obtidas no teste de emergência em sementes de feijoeiro após a aplicação dos pré-tratamentos, do envelhecimento artificial em diferentes períodos e de secagem<sup>1</sup>.**

Experimento	Pré-tratamento	Períodos (h) de envelhecimento artificial				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	90,5aA	84,5aA	48,9bB	19,8cB	12,0cB
	Assepsia + BDA	95,1aA	86,1abA	74,8bcA	59,4cdA	43,2dA
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	47,5aB	41,5aB	17,0bC	1,8cC	0,0cC
2	Assepsia	92,1aA	87,5aA	61,5bB	42,0cB	23,7dC
	Assepsia + BDA	89,3aA	92,2aA	87,1aA	68,8bA	63,2bA
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	89,5aA	88,4aA	71,2bB	59,5bcA	46,5cB
3	Assepsia	73,1aA	62,1aB	14,4bB	7,9bC	1,1cB
	Assepsia + BDA	78,5aA	66,1abB	58,3bA	39,9cB	18,2dA
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	83,1aA	79,7aA	54,1bA	60,6bA	12,4cA

<sup>1</sup> Em cada experimento, médias seguidas por mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

**TABELA 6. Dados (μmhos/cm/g) obtidos no teste de condutividade elétrica em sementes de feijoeiro após a aplicação dos pré-tratamentos, do envelhecimento artificial em diferentes períodos e de secagem<sup>1</sup>.**

Experimento	Pré-tratamento	Períodos (h) de envelhecimento artificial				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	76,5dA	100,7cA	141,0bA	159,7bA	193,8aB
	Assepsia + BDA	60,8bA	79,0abB	85,7aB	83,5aB	91,8aC
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	67,9eA	90,6dAB	126,0cA	170,7bA	237,7aA
2	Assepsia	77,3cA	101,2cA	130,9bA	158,5aA	159,1aA
	Assepsia + BDA	55,9bA	70,0bB	102,6aB	105,7aB	105,6aB
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	68,6cA	87,3bcAB	113,0aAB	112,2abB	118,0aB
3	Assepsia	76,0dA	94,4cA	139,0bA	144,7abA	158,7aA
	Assepsia + BDA	65,0bAB	76,3abB	81,5abB	81,4abB	89,1aB
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	58,9cB	65,0bcB	82,7aB	80,2abB	88,5aB

<sup>1</sup> Em cada experimento, médias seguidas por mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

**TABELA 7. Dados (ppm/g) obtidos no teste de lixiviação de potássio em sementes de feijoeiro após a aplicação dos pré-tratamentos, do envelhecimento artificial em diferentes períodos e de secagem<sup>1</sup>.**

Experimento	Pré-tratamento	Períodos (h) de envelhecimento artificial				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	118,2eB	332,9dAB	509,5cA	730,8bB	1035,8aB
	Assepsia + BDA	240,8aAB	250,3aB	359,1aB	341,1aC	327,6aC
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	381,8cA	444,8cA	515,4cA	1078,5bA	1542,8aA
2	Assepsia	199,9cA	361,4bcA	542,3bA	1193,4aA	1207,0aA
	Assepsia + BDA	254,9bA	372,0abA	496,4aA	476,0aB	492,5aB
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	243,7cA	321,3bcA	444,3abA	479,8abB	544,5aB
3	Assepsia	455,6dA	883,5cA	1029,2bA	1284,5aA	1110,9bA
	Assepsia + BDA	294,3bB	322,2bB	465,8aB	462,0aB	460,9aB
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	246,4bB	358,6abB	370,4aB	384,4aB	473,9aB

<sup>1</sup> Em cada experimento, médias seguidas por mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).



mente, favorecem o aparecimento de danos aos tecidos embrionários durante a embebição.

O emprego de BDA manteve, em todos os experimentos, a capacidade de minimizar os efeitos fisiológicos negativos oriundos do processo de envelhecimento.

### Considerações gerais

Os resultados de desempenho, parcialmente influenciados pela deterioração fisiológica advinda do envelhecimento, sofreram interferências da presença de fungos que, pela constância do surgimento de *Aspergillus* spp. em todos os experimentos, não puderam ser medidas, no tocante a cada fungo, com a precisão prevista pelo método empregado.

Dentre as incidências dos fungos estudados, a de *Aspergillus* spp. mostrou-se favorecida pela ampliação do período de envelhecimento artificial ao ponto de, em todos os experimentos, dificultar a diferenciação entre as causas fisiológicas e as sanitárias envolvidas na deterioração das sementes. Especialmente nos testes de tetrazólio, de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio, que fazem uma estimativa da situação histológica existente no embrião, a presença de *Aspergillus* spp. pareceu diretamente envolvida com os danos celulares detectados.

### CONCLUSÕES

1. O teste de envelhecimento artificial, associando causas fisiológicas e sanitárias em seus resultados, apresenta limitações para as estimativas de vigor.

2. A presença de fungos, principalmente de *Aspergillus* spp., interfere negativamente no desempenho fisiológico das sementes envelhecidas artificialmente.

### REFERÊNCIAS

- AMORIM, H.V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração da qualidade**. Piracicaba : USP-ESALQ, 1978. 85p. Tese de Livre-Docência.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- CHING, T.M. Aging stresses on physiological and biochemical activities of crimson clover (*Trifolium incarnatum* L. var. Dixie) seeds. **Crop Science**, Madison, v.12, n.4, p.415-418, July/Aug. 1972.
- CHING, T.M.; SCHOOLCRAFT, I. Physiological and chemical differences in aged seeds. **Crop Science**, Madison, v.8, n.4, p.407-409, July/Aug. 1968.
- FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; COSTA, N.P.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina : Embrapa-CNPSo, 1988. 58p.
- FURLAN, S.H. **Efeito de regiões e épocas de produção na qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de São Paulo**. Piracicaba : USP-ESALQ, 1986. 130p. Dissertação de Mestrado.
- HARMAN, G.E.; NEDROW, B.L.; CLARK, B.E.; MATTICK, L.R. Association of volatile aldehyde production during germination with poor soybean and pea seed quality. **Crop Science**, Madison, v.22, n.4, p.712-716, July/Aug. 1982.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, Zurich, v.3, n.3/4, p.881-888, July/Oct. 1975.
- LIMA, E.F.; CARVALHO, L.P.; CARVALHO, J.M.F.C. Comparação de métodos de análise sanitária e ocorrência de fungos em sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.3, p.401-406, out. 1982.
- LIN, S.S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.2, n.2, p.1-6, dez. 1990.
- MCDONALD, M.B.; GUPTA, I.J.; SCHMITTHENNER, A.F. Effect of storage fungi on seed vigour of soybean. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.21, n.3, p.581-591, June 1993.
- MARCOS FILHO, J.; AMORIM, H.V.; SILVAROLLA, M.B.; PESCARIN, H.M.C. Relações entre germinação, vigor e permeabilidade das membranas celulares durante a maturação de sementes de soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1981, Brasília. **Anais**. Londrina : Embrapa-CNPSo, 1982. p.676-688.

- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Eds.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal : FUNEP, 1994. p.133-149.
- MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba : FEALQ, 1987. 230p.
- MARCOS FILHO, J.; PESCARIN, H.M.C.; KOMATSU, Y.H.; DEMÉTRIO, C.G.B.; FANCELLI, A.L. Testes para avaliação do vigor de sementes de soja e suas relações com a emergência das plântulas em campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, n.5, p.605-613, maio 1984.
- MENTEN, J.O.M. Sanidade, germinação e vigor de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.4, n.2/4, p.105-110, jan./abr. dez. 1978.
- MENTEN, J.O.M. Teste de sanidade das sementes das regras para análise de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 1., 1988, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba : FEALQ, 1988. p.43-62.
- MULLET, J.H.; CONSIDINE, J.A. Potassium release and uptake in germinating legume seeds in relation to seed condition and germination environment. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.31, n.120, p.151-162, June 1980.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Eds.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal : FUNEP, 1994. p.59-65.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London : MacMillan, 1979. v.1, 839p.
- PANDEY, D.K. Priming induced alleviation of the effects of natural ageing derived selective leakage of constituents in French bean seeds. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v.17, n.2, p.391-397, Apr. 1989.
- PANDEY, D.K. Priming induced repair in French bean seeds. **Seed Science and Techonology**, Zurich, v.16, n.2, p.527-532, Apr. 1988.
- PARRISH, D.J.; LEOPOLD, A.C. On the mechanism of aging in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.61, n.3, p.365-368, Mar. 1978.
- PEARCE, R.S.; ABDEL SAMAD, I.M. Change in fatty acid content of polar lipids during ageing of seeds of peanut (*Arachis hypogea* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.31, n.124, p.1283-1290, Oct. 1980.
- TANAKA, M.A.S.; CORRÊA, M.U. Influência de *Aspergillus* e *Penicillium* no armazenamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n.3, p.451-456, out. 1981.
- TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M.; MARIANNO, M.I.A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v.15, n.3/4, p.232-237, jul./dez. 1989.
- TILDEN, R.L.; WEST, S.H. Reversal of the effects of aging in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.77, n.3, p.584-586, Mar. 1985.