



MÉTODOS DE DETECÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES DE FEIJÃO DA COLEÇÃO DE BASE DA EMBRAPA

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO; SOLANGE CARVALHO BARRIOS ROVERI JOSE; JOSEANE PADILHA SILVA;
EMBRAPA CENARGEN, BRASÍLIA, DF, BRASIL;
cheila.sbalcheiro@embrapa.br

Resumo: Este trabalho objetivou estabelecer um método de detecção a ser utilizado no teste de sanidade da coleção de base de germoplasma semente armazenada a longo prazo, a -20°C . As sementes de feijão foram testadas nos métodos de detecção: Papel de Filtro, meio de cultura BDA e Rolo de Papel e em diferentes tamanhos de amostra: 400 (8x50, 16x25), 200 (4x50, 8x25), 100 (2x50, 4x25), 50 (5x10, 2x25) e 24(2x12). Foram identificados 14 fungos associados às sementes de feijão, ocorrendo fungos de campo, patogênicos, armazenamento e contaminantes. Observaram-se diferenças de detecção de fungos quando os métodos foram comparados, bem como quando variou o tamanho da amostra analisada. O método de detecção Papel de Filtro detectou maior número de fungos diferentes e não apresentou diferenças na incidência total quando o tamanho da amostra foi variado.

Palavras-chave: Colbase, incidência, patologia

Introdução

A Coleção de Base de Germoplasma Semente – Colbase destina-se ao armazenamento de germoplasma semente em condições que permitam a manutenção da integridade dos recursos genéticos vegetais. Para isso, são utilizadas câmaras frias à -20°C , para o armazenamento das sementes a longo prazo. No entanto, as condições ideais para a conservação do germoplasma semente são igualmente ideais para a conservação de patógenos a ele associado.

O germoplasma semente destinado à conservação na Colbase é avaliado quanto à qualidade fisiológica e sanitária antes de entrar na coleção e monitorado periodicamente para manter um padrão de viabilidade. Segundo Faiad et al.(2001), o teste de sanidade deve ser realizado para avaliar a ocorrência de patógenos associados ao germoplasma semente, o qual tem se constituído numa importante via de transmissão e sobrevivência de patógenos. Além disso, a presença de fungos de armazenamento pode comprometer a qualidade fisiológica de sementes de coleções conservadas a longo prazo na Colbase.

Muitas vezes, na rotina da Colbase, é preciso diminuir a quantidade de sementes destinadas as análises, principalmente para os acessos com restrição de quantidade de sementes. Por isso, as análises



devem utilizar métodos precisos de detecção, viáveis e que representem com confiabilidade a qualidade das sementes destinadas ao armazenamento a longo prazo. Além do mais, é importante que o usuário do germoplasma tenha conhecimento do tipo de contaminante associado à semente. Desta forma, objetivou-se com este trabalho definir um método de detecção de fungos em sementes, eficiente para utilização em coleções de Banco de Germoplasma.

Material e Métodos

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), safra 2011, com contaminação natural, foram testadas em três métodos de detecção: Papel de Filtro (Blotter test), meio de cultura sólido BDA e Rolo de Papel (Germitest); em diferentes tamanhos de amostra: 400 sementes (8x50 e 16x25), amostra recomendada pelas Regras de Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009) e amostras em teste de 200 (4x50, 8x25), 100 (2x50, 4x25), 50 (5x10, 2x25) e 24 (2x12) sementes. No método de Papel de Filtro, em 'gerbox', as sementes foram dispostas uniformemente sobre papel mata borrão umedecido com água destilada estéril. Para o método de plaqueamento em meio de cultura BDA (Potato Dextrase Agar 39g/1L) as sementes foram previamente desinfestadas (solução de hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos e três lavagens com água destilada estéril por 2 minutos) antes da distribuição sobre o meio de cultura. Nos dois métodos, os 'gerbox' foram mantidos em câmara de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12 horas. No método Rolo de Papel as sementes foram distribuídas uniformemente sobre duas folhas de papel umedecido e cobertas com uma terceira folha de papel, procedendo-se a confecção dos rolos e mantidos verticalmente em germinador a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. A análise sanitária procedeu após sete dias de incubação para todos os métodos. As sementes foram avaliadas individualmente, observando a ocorrência de frutificações típicas do crescimento fúngico em estereomicroscópio e quando necessário foram identificadas em microscópio óptico. Os resultados foram expressos em percentagem de ocorrência dos fungos em relação ao número de sementes, presença e ausência. A análise estatística dos dados da incidência total dos fungos foi realizada no programa Sisvar, e a comparação das médias por Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

As sementes de feijão avaliadas quanto à qualidade sanitária apresentaram a incidência de 14 fungos, assim agrupados: Fungos de Armazenamento: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium* sp.; Fungos de Campo e Patogênicos: *Alternaria alternata*,



Alternaria brassicae, *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. e Fungos Contaminantes: *Cladosporium* sp., *Pithomyces* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. e *Mucor* sp. Foram observadas diferenças na detecção das espécies de fungos incidentes nas sementes de feijão quanto houve variação do método e do tamanho da amostra (Tabela 1).

Tabela 1 Detecção de fungos em três métodos em relação ao número de sementes e diferentes combinações de repetições em sementes de feijão

Tamanho da amostra	Presença de fungos											
	Papel de Filtro				Rolo de Papel				BDA			
	A*	F	C	Total	A	F	C	Total	A	F	C	Total
8x50	4	5	3	12	3	2	3	8	4	2	1	7
16x25	4	5	3	12	3	3	3	9	4	2	1	8
4x50	4	4	4	12	3	2	2	7	2	1	1	4
8x25	4	5	2	11	3	2	3	8	3	1	1	5
2x50	4	3	3	10	3	2	1	6	3	1	1	5
4x25	4	4	3	11	3	1	1	5	3	3	1	7
5x10	4	4	2	10	3	1	1	5	4	2	1	7
2x25	4	3	3	10	3	1	2	6	1	2	1	4
2x12	3	2	3	8	1	2	1	4	1	3	1	5

* Presença de fungos: A= Fungos de armazenamento, F= Fungos de campo e patogênicos, C= Fungos contaminantes.

Ao comparar o tamanho da amostra no método Papel de Filtro, foi possível constatar diferenças de detecção de espécies diferentes de fungos. No entanto, a redução da detecção foi observada nas espécies de fungos contaminantes como *Rhizopus* sp., *Pithomyces* sp., *Trichoderma* sp. e *Mucor* sp. Em todos os tamanhos de amostra o método Papel de Filtro foi superior na detecção de fungos que os demais métodos.

Ao comparar os diferentes métodos pela avaliação da incidência total observou-se que o método de Papel de Filtro apresentou a maior incidência total de fungos (Tabela 2). Os métodos de Rolo de Papel e BDA não apresentaram diferenças estatísticas entre si, constatando-se menor incidência total de fungos nas sementes. O método de Papel de Filtro detectou mais espécies de fungos que os outros métodos principalmente fungos de armazenamento, de campo e patogênicos que os demais métodos. A detecção de fungos destes dois grupos na análise sanitária de sementes da Colbase é fundamental para definição da incorporação dos acessos, procedimentos para a monitoração e uso do germoplasma. O método BDA apresentou baixa detecção de fungos contaminantes, podendo estar relacionado à desinfestação superficial das sementes com hipoclorito de sódio, provavelmente eliminando os fungos contaminantes que estavam aderidos a superfície das sementes.



Tabela 2 Incidência total de fungos em sementes de feijão em três métodos de detecção e diferentes tamanhos de amostra

Tamanho da amostra	Incidência Total de Fungos (%)		
	Método		
	Papel de Filtro	Rolo de Papel	BDA
8x50	83 aA*	32 bB	24 dcB
16x25	82 aA	42 abB	55 abcB
4x50	77 aA	30 bB	45 bcdB
8x25	87 aA	46 abB	40 bcdB
2x50	77 aA	37 abB	53 abcAB
4x25	78 aA	52 abB	27 dcC
5x10	105 aA	56 abB	68 abB
2x25	87 aA	58 abB	22 dC
2x12	100 aA	66 aB	79 aAB

* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conclusões

Um maior número de diferentes fungos foi detectado em sementes de feijão pelo método de Papel de Filtro comparado aos métodos BDA e Rolo de Papel. O método de Papel de Filtro foi recomendado para análise sanitária da coleção de Base da Embrapa, pois detecta maior incidência total de fungos e poucas diferenças em relação ao tamanho da amostra.

Referências Bibliográficas

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS. 399p. 2009.
- FAIAD, M.G.R.; Goedert, C.O.; Wetzell, M.M.V.S.; Silva, D.B.; Pereira Neto, L.G. Banco de Germoplasma de Sementes da Embrapa. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 31p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Documentos**, 71).