

EFEITOS DA ASSEPSIA SUPERFICIAL COM DIFERENTES AGENTES QUÍMICOS NA INCIDÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM SEMENTES DE SOJA¹

MARIA DE FÁTIMA ZORATO², MARTIN HOMECHIN³ E ADEMIR ASSIS HENNING⁴

RESUMO - A contaminação superficial por microrganismos pode dificultar a avaliação da qualidade fisiológica e sanitária da semente. Este estudo visou avaliar os efeitos de agentes químicos aplicados em diferentes concentrações, pH, tempos de imersão necessários para assepsia eficiente e os efeitos que esses agentes exercem nos microrganismos. Sementes de soja, cultivar Parecis (MTBR-50), procedentes de Barreiras, BA, que apresentavam contaminação natural por *Aspergillus flavus* (100%), foram submetidas a tratamentos com hipoclorito de sódio, Q-boa[®], Brilhante[®], Agrotensil[®] e Lysoform[®]. As sementes foram imersas em soluções desses agentes, nas concentrações de 1%, 2%, 3%, 5% e 10%, por períodos de dois, cinco e 10 minutos. Em todas as concentrações foram determinados os respectivos pH. Após a imersão, as sementes foram lavadas em água deionizada e esterilizada. Para o teste de sanidade, foi utilizado o método do papel de filtro e empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. A identificação dos microrganismos foi realizada após sete dias de incubação. O Lysoform[®], na concentração de 10%, com tempo de imersão de 10 minutos e pH 6,50 eliminou os fungos *Aspergillus flavus* e *Rhizopus* spp., porém, propiciou elevado desenvolvimento de bactérias (42%). O hipoclorito de sódio, a partir da concentração de 3%, com período de imersão de cinco minutos e pH 11,40 propiciou decréscimo dos fungos de armazenamento, mas não os eliminou, foi também o tratamento que apresentou os menores índices de bactérias (26%).

Termos para indexação: *Glycine max*, sanidade, concentração, imersão.

SURFACE DESINFESTATION EFFECTS WITH DIFFERENTS CHEMICAL SUBSTANCES ON THE MICROORGANISMS INCIDENCE IN SOYBEAN SEEDS

ABSTRACT - Surface contamination of the seed with microorganisms may difficult the evaluation of its physiological and sanitary quality. This study was conducted to evaluate the effects of chemical substances (compounds) applied in different concentrations, pH and timing of immersion of the seed to effective surface sterilization of the seed and its effects on the microorganisms. Soybean seeds, cultivar Parecis (MTBR-50) produced in Barreiras, BA, with high level of natural infection (contamination) of *Aspergillus flavus* (100%), were pretreated with sodium hypochlorite, Q-boa[®], Brilhante[®], Agrotensil[®] and Lysoform[®], in the following concentrations and times of immersion, 1%, 2%, 3%, 5% and 10% for two, five and ten minutes. The pH of the solutions was determined for each compound in every concentration. After immersion, seeds were rinsed in sterile deionized water. The health test was accomplished using filter paper and a completely randomized experimental design with five replications. The percentage of the microorganisms present was recorded the incubation period after seven days. *Aspergillus flavus* and *Rhizopus* spp. were eliminated by the 10% Lysoform[®] solution, after ten minutes of immersion (pH 6,50). However, this treatment resulted in 42% of seeds infected with bacteria. Sodium hypochlorite, was more

¹ Aceito para publicação em 09.05.2001; trabalho realizado com auxílio do CNPq.

² Bióloga, curso de Mestrado em Agronomia, Depto. de Agronomia, CCA/UEL, Londrina, PR; e-mail: fzorato@terra.com.br

³ Eng^o Agr^o, Prof., Dr., Depto. de Agronomia, CCA/UEL; Cx. Postal 6001, 86051-970, Londrina-PR.

⁴ Eng^o Agr^o, PhD., Pesquisador da Embrapa Soja; Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina-PR; e-mail: henning@cnpso.embrapa.br

effective in solutions with concentrations above 3% and immersion periods over five minutes (pH 11,40). This treatment reduced but did not eradicate the storage fungi from the seeds and resulted in lower incidence of bacteria (average 26%).

Index terms: *Glycine max*, health, concentrations, immersion.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é cultivada em muitas regiões do mundo. É considerada a mais importante cultura oleaginosa, possuindo componentes alimentícios valiosos à humanidade. Desta forma, sementes desta espécie assumem papel relevante e sua qualidade se torna fundamental no processo de produção.

Devido às suas características morfológica e química, as sementes de soja têm a qualidade influenciada pelo genótipo, condições ambientais durante o seu desenvolvimento, condições de colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento (Pereira et al., 1995 e Resende et al., 1996).

Existem fungos patogênicos que podem se associar às sementes de soja durante o seu desenvolvimento ou após a maturação (Christensen, 1972). Essa associação pode ocorrer por diferentes maneiras como, contaminação superficial ou colonização dos tecidos internos (Teixeira et al., 1997). Durante o período de armazenamento, quando a umidade relativa do ar, a umidade da semente e a temperatura se eleva, ocorrem condições favoráveis para a aceleração dos processos bioquímicos, os quais exercem efeito na ação de microrganismos. Isto acontece, principalmente com os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp., que contribuem para a deterioração da semente (Christensen & Kaufmann 1969; Tanaka & Correa, 1981; Kabeere & Taligoola, 1983; Lima et al., 1984; McLean et al., 1984; Henning, 1987; Novembre & Marcos-Filho, 1991 e Paiva et al., 1995). Popinigis (1979) verificou que esporos e micélios desses microrganismos, de modo freqüente, estavam presentes na superfície das sementes armazenadas. Entretanto, Harmon & Pflieger (1974) encontraram *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp., na forma de micélio, localizados no tegumento mas, também nas partes internas da semente.

Lopes et al. (1991) e Castellani et al. (1996), observaram que os danos originados pela infestação nas sementes podem afetar, de forma severa, sua qualidade fisiológica e a qualidade sanitária, e alguns casos, inibindo por completo ou reduzindo a capacidade germinativa do lote de sementes. Durante a realização do teste de sanidade, o crescimento acentuado de microrganismos saprófitas pode não afetar a semente, mas dificulta o exame individual dessa, uma vez que com-

petem com os patógenos, comprometendo a precisão do teste (Hewett, 1979; Yorinori, 1987; Machado & Langerak, 1993 e Castellani et al., 1996). O mesmo problema é verificado na avaliação do vigor (teste de envelhecimento acelerado) que, normalmente, apresenta grande contaminação por *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp. De acordo com Custódio et al. (1995), muitas vezes, a contaminação impede o real conhecimento da qualidade da semente.

A infestação superficial da semente por microrganismos está mais sujeita à ação de alguns fatores externos os quais podem reduzir as chances de sua transmissão à progênie, como por exemplo, o tratamento com agentes desinfestantes (Teixeira et al., 1997). O tratamento de sementes com agentes químicos auxilia na redução do número de saprófitas permitindo, assim, que os fungos internos na semente possam crescer e ser identificados.

Sauer & Burroughs (1986) observaram que a destruição dos esporos fúngicos da superfície das sementes depende da espécie do fungo e da condição da semente, da quantidade de contaminação superficial, do tempo de imersão, do pH, concentração do desinfestante e sua marca comercial.

Substâncias como solventes orgânicos, quando aplicadas sozinhas, têm apresentado bons resultados contra patógenos veiculados por sementes e, de acordo com Ellis et al. (1976) e Vidhyasekaran (1980), o diclorometano (CH_2Cl_2) apresentou reação antifúngica. Hidrocarbonetos como ciclohexano, querosene e xileno, nos estudos de Abdel-Mallek et al. (1995), reduziram os fungos das sementes de soja e inibiram a produção de aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus*.

Nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) é indicada a assepsia superficial com hipoclorito de sódio (NaOCl), na concentração de 1%, por três minutos. Entretanto, a ISTA (1976), recomenda esse tratamento por 10 minutos, na mesma concentração. Foi observado, na literatura, que a assepsia superficial vem sendo utilizada em muitos estudos, porém, existe grande variabilidade quanto ao agente químico, a concentração da solução e o tempo de exposição. Diante dessa situação e da inexistência de consenso sobre esse assunto, o presente estudo teve como objetivo avaliar: o efeito de diferentes agentes químicos em diferentes concentrações, pH e o tempo de imersão para assepsia eficiente nos microrganismos infestantes em sementes de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no laboratório de Patologia de Sementes da Embrapa Soja, em Londrina, PR.

Sementes de soja, cultivar Parecis (MTBR-50), produzidas na safra de 1996/97, em Barreiras, BA, fora armazenadas, da colheita até o início dos testes, em silo de sementes na temperatura de $16 \pm 1^\circ\text{C}$ e 40% de UR. Foi realizado o teste de germinação com 400 sementes e subamostras de 50, utilizando-se o rolo de papel, umedecido com uma quantidade de água 2,5 vezes o peso seco do substrato, a 25°C e a contagem foi no 7º dia após a semeadura, de acordo com Brasil (1992), que apresentou elevada quantidade de plântulas anormais (20%) e também contaminação natural por *Aspergillus flavus* (100%). As sementes foram submetidas a tratamentos para assepsia superficial, com hipoclorito de sódio (10% a 12% de cloro ativo), Q-boa® (2,0% a 2,5% de cloro ativo, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e água), Brilhante® (2,0% a 2,5% de cloro ativo, hidróxido de sódio, silicato de sódio e água), Lysoform® (solução bactericida que contém soluto de formaldeído, cloreto bencil-amônico de lauril-dimetilo, álcool etílico oficial, essência de eucalipto citriodora e água depurada) e Agrotensil® (solução aquosa contendo nonifenol oxietilato, álcool isopropílico e álcool polivinílico). As sementes foram imersas em soluções desses agentes nas concentrações de 1%, 2%, 3%, 5% e 10% por períodos de exposição de dois, cinco e 10 minutos. Em todas as concentrações, foi determinado o respectivo pH (potencial hidrogeniônico). Após a imersão, as sementes foram lavadas em água deionizada e esterilizada.

Em seguida, foi realizado o teste de sanidade, utilizando o método do papel de filtro, com 400 sementes e subamostras de 20, tanto para sementes tratadas como para não tratadas (testemunha), que foram distribuídas sobre quatro folhas de papel de filtro ($80\text{g}/\text{m}^2$) umedecidas em água deionizada esterilizada, dispostas no interior de caixas plásticas tipo gerbox ($11 \times 11 \times 3,5\text{cm}$), previamente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio 1,05%, conforme prescrição de Henning (1987). A incubação das sementes foi com luz contínua (lâmpadas fluorescente, branca 40w) e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, durante sete dias. A avaliação e a identificação dos microrganismos foram realizadas no 7º dia (período em que a germinação praticamente não ocorreu, porque o ambiente, placa + papel, não favorece o processo) com auxílio de microscópio estereoscópico com aumentos de seis a 50x e, quando necessário, foram feitas lâminas, utilizando microscópio biológico (400x) para confirmação dos resultados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, e cada parcela experimental constituída por uma caixa plástica de 20 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. A partir dos dados foram obtidas as médias das parcelas, as quais não foram submetidas à análise de variância e sim a uma análise descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas sementes sem tratamento (testemunha) foram detectados 100% de *Aspergillus flavus*, 55% de *Rhizopus* spp., 1% de *Penicillium* spp. e 1% de bactérias.

Os efeitos dos agentes desinfestantes empregados variaram de acordo com a concentração, pH da solução e tempo de imersão das sementes. O hipoclorito de sódio (Tabela 1), a partir da concentração de 3%, no tempo de cinco minutos e pH 11,40 diminuiu a infestação de *Aspergillus flavus* e *Rhizopus* spp.

Q-boa®, produto comum em uso doméstico, reduziu a incidência de *Rhizopus* spp., em todas as concentrações, pH e tempos de imersão. Porém, o *Aspergillus flavus* foi reduzido apenas quando utilizado na concentração de 10%, pH 11,09 nos tempos de cinco e 10 minutos (Tabela 2).

A solução Brilhante®, também não favoreceu a assepsia total das sementes infestadas, mas reduziu a incidência *Aspergillus flavus*, na concentração de 10%; tempo 10 minutos, pH de 12,12 (Tabela 3). Hewett (1979) em seus estudos, não considerou o tempo como fator crítico no tratamento de sementes de ervilha e feijão contaminadas com *Ascochyta* spp. Ainda, com relação a Brilhante®, em algumas concentrações e tempo de imersão, se verificou o desenvolvimento de *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp. De acordo com Sauer & Burroughs (1986), soluções que possuem cloro como principal componente, quando nas menores diluições, têm o pH e eficiência da assepsia superficial de sementes reduzidas. Estes mesmos autores relataram que a concentração de organismos, a exemplo do *Aspergillus flavus* (100%), neste estudo, pode se constituir em fator limitante na desinfestação das sementes.

Na forma de solução aquosa, o Agrotensil® (Tabela 4), contendo nonifenol oxietilato, álcool isopropílico e álcool polivinílico, apresentou menor eficiência na assepsia superficial das sementes de soja, não demonstrando atividade antifúngica.

Por outro lado, Lysoform® (Tabela 5), quando empregado na concentração de 10%, pH 6,50 e tempo de 10 minutos eliminou *Aspergillus flavus* e *Rhizopus* spp. demonstrando que os mesmos não estavam localizados nos tecidos internos

TABELA 1. Efeitos da assepsia superficial com hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, pH e tempos de imersão (TI), na incidência de microrganismos em sementes de soja, cv. Parecis, produzidas na safra de 1996/97, em Barreiras, BA. Embrapa Soja/UEL, Londrina, PR, 1998.

Concentração (%)	pH	TI (minutos)	Incidência de microrganismos nas sementes (%)*				Bactérias
			<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	
1	10,47	2	64	0	0	0	9
1	10,47	5	72	0	0	0	29
1	10,47	10	65	0	0	0	31
2	11,15	2	62	0	0	0	11
2	11,15	5	53	0	0	0	32
2	11,15	10	38	0	0	0	29
3	11,40	2	43	0	0	0	24
3	11,40	5	26	1	2	0	26
3	11,40	10	23	0	0	0	31
5	11,67	2	25	0	0	0	16
5	11,67	5	27	1	0	0	26
5	11,67	10	13	0	0	0	28
10	11,69	2	29	0	0	0	31
10	11,69	5	32	0	0	0	35
10	11,69	10	17	0	0	0	27
Testemunha	—	—	100	1	55	0	1

* Média de cinco repetições.

TABELA 2. Efeitos da assepsia superficial com Q-boa[®], em diferentes concentrações, pH e tempos de imersão (TI), na incidência de microrganismos em sementes de soja, cv. Parecis, produzidas na safra de 1996/97, em Barreiras, BA. Embrapa Soja/UEL, Londrina, PR, 1998.

Concentração (%)	pH	TI (minutos)	Incidência de microrganismos nas sementes (%)*				Bactérias
			<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	
1	9,55	2	91	0	4	0	27
1	9,55	5	75	0	6	0	27
1	9,55	10	85	0	0	0	37
2	9,89	2	72	0	6	0	18
2	9,89	5	87	0	3	0	34
2	9,89	10	60	0	0	0	26
3	10,16	2	70	0	0	0	27
3	10,16	5	67	0	0	0	32
3	10,16	10	68	0	0	0	35
5	10,47	2	61	0	0	0	26
5	10,47	5	51	0	0	0	30
5	10,47	10	36	0	0	0	33
10	11,09	2	42	0	0	0	21
10	11,09	5	27	0	0	0	25
10	11,09	10	15	0	0	0	39
Testemunha	—	—	100	1	55	0	1

* Média de cinco repetições.

TABELA 3. Efeitos da assepsia superficial com Brillhante[®], em diferentes concentrações, pH e tempos de imersão (TI), na incidência de microrganismos em sementes de soja, cv. Parecis, produzidas na safra de 1996/97, em Barreiras, Ba. Embrapa Soja/UEL, Londrina, PR, 1998.

Concentração (%)	pH	TI (minutos)	Incidência de microrganismos nas sementes (%)*				
			<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Bactérias
1	11,27	2	72	2	5	0	21
1	11,27	5	73	2	0	0	33
1	11,27	10	73	0	0	0	38
2	11,56	2	68	1	0	0	20
2	11,56	5	64	0	5	0	34
2	11,56	10	70	0	0	0	34
3	11,70	2	54	2	10	0	32
3	11,70	5	72	1	10	0	35
3	11,70	10	52	0	0	0	36
5	11,89	2	60	0	5	0	25
5	11,89	5	46	0	0	0	33
5	11,89	10	43	2	0	0	52
10	12,12	2	32	1	0	0	40
10	12,12	5	34	0	0	0	27
10	12,12	10	24	1	0	0	50
Testemunha	-	-	100	1	55	0	1

* Média de cinco repetições.

TABELA 4. Efeitos da assepsia superficial com Agrotensil[®], em diferentes concentrações, pH e tempos de imersão (TI), na incidência de microrganismos em sementes de soja, cv. Parecis, produzidas na safra de 1996/97, em Barreiras, BA. Embrapa Soja/UEL, Londrina, PR, 1998.

Concentração (%)	pH	TI (minutos)	Incidência de microrganismos nas sementes (%)*				
			<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Bactérias
1	6,13	2	91	2	71	0	25
1	6,13	5	99	4	100	0	33
1	6,13	10	100	1	85	0	31
2	5,46	2	82	0	100	0	11
2	5,46	5	97	0	100	0	27
2	5,46	10	100	0	49	0	44
3	5,44	2	95	0	100	0	16
3	5,44	5	100	0	32	0	24
3	5,44	10	100	0	90	0	33
5	5,34	2	99	0	82	0	26
5	5,34	5	100	0	38	0	27
5	5,34	10	100	0	47	0	41
10	5,29	2	100	3	26	0	23
10	5,29	5	100	3	55	0	18
10	5,29	10	100	1	42	0	17
Testemunha	-	-	100	1	55	0	1

* Média de cinco repetições.

TABELA 5. Efeitos da assepsia superficial com Lysoform[®], em diferentes concentrações, pH e tempos de imersão (TI), na incidência de microrganismos em sementes de soja, cv. Parecis, produzidas na safra de 1996/97, em Barreiras, BA. Embrapa Soja/UDEL, Londrina, PR, 1998.

Concentração (%)	pH	TI (minutos)	Incidência de microrganismos nas sementes (%)*				
			<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Bactérias
1	7,31	2	95	7	85	0	39
1	7,31	5	96	0	100	0	38
1	7,31	10	76	5	80	0	26
2	6,74	2	79	3	42	0	22
2	6,74	5	89	6	55	0	31
2	6,74	10	83	2	65	0	38
3	6,63	2	80	2	12	0	33
3	6,63	5	63	1	9	0	28
3	6,63	10	62	3	10	0	32
5	6,51	2	77	3	6	0	22
5	6,51	5	33	5	10	0	37
5	6,51	10	9	1	5	0	35
10	6,50	2	6	0	2	0	32
10	6,50	5	1	0	3	2	36
10	6,50	10	0	0	0	5	42
Testemunha	—	—	100	1	55	0	1

* Média de cinco repetições.

(embrião) das sementes. Ainda, nessas condições, foi possível detectar *Fusarium* spp. evidenciando, desta forma, que invasão acentuada de fungos infestantes, em especial o *Aspergillus flavus*, pode ocultar patógenos na semente. Todavia, Lysoform[®] quando utilizado em menores concentrações, favoreceu a incidência de *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp.

De modo geral, foi constatada baixa incidência de *Penicillium* spp., fato que pode ser atribuído à competitividade deste com *Aspergillus* spp., conforme sugerido por Vechiato et al. (1994). O referido microrganismo foi detectado, principalmente, em sementes cobertas por bactérias (*Bacillus subtilis*), porém, observado em maior frequência, em sementes que apresentavam visualmente danificações mecânicas (rachaduras), local onde ocorre lixiviação dos constituintes intracelulares. Kabeere & Taligoola (1983) relataram que os danos mecânicos fornecem entradas para a invasão de fungos de armazenamento e, em consequência, aceleram a deterioração das sementes. Esporos fúngicos, aderidos às rachaduras em sementes, podem ser protegidos do contato com o agente desinfestante e, assim, não ocasionar a morte de todos os esporos (Sauer & Burroughs, 1986).

Para *Rhizopus* spp. foram observadas variações nos tratamentos avaliados, sendo constatado, maior ocorrência, em

sementes mortas. Kabeere & Taligoola (1983) obtiveram resultados indicando a contribuição do *Rhizopus* spp., na redução da germinação de sementes de soja armazenadas. Resultado semelhante foi obtido por Lima et al. (1984), em sementes de algodão. Outra consideração importante foi relatada por Phipps (1984), na qual, o *Rhizopus* spp. aparece como importante patógeno de sementes em amendoim, porém, não provocando doenças em plântulas no campo. De acordo com Tanaka & Machado (1985), nem sempre a associação de patógenos com as sementes resulta em doenças após a semeadura. Apesar da patogenicidade do *Rhizopus* spp., ainda não ter sido esclarecida totalmente, existem preocupações quanto aos possíveis efeitos desse fungo sobre a qualidade das sementes (Novembre & Marcos-Filho, 1991).

Todos os agentes químicos utilizados favoreceram a formação de colônias de bactéria (*Bacillus subtilis*), comum em sementes de soja. A taxa média de bactéria encontrada no hipoclorito de sódio foi de 26%, Q-boa[®] 29%, Brillhante[®] 34%, Agrotensil[®] 26%, Lysoform[®] 33%. No caso específico de Lysoform[®] é possível de que o produto, apesar de ser bactericida, não seja eficiente para *Bacillus subtilis*.

A desinfestação de sementes, de acordo com Kabeere & Taligoola (1983), reduz a competição entre fungos e bactérias.

as, capacitando-as a se desenvolverem livremente e se alimentarem, de forma saprofítica, em tecidos enfraquecidos ou mortos das sementes.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo pode-se concluir que:

- ♦ Hipoclorito de sódio, Q-boa®, Brilhante® e Agrotensil®, não eliminam os infestantes presentes nas sementes de soja;
- ♦ Lysoform® pode ser utilizado para eliminar infestantes, na concentração de 10%, pH 6,50 no tempo de imersão de 10 minutos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MALLEK, A.Y.; HASAN, H.A.H & BAGY, M.M.K. Efficacy of hydrocarbons against soybean seed-borne fungi and aflatoxin production. *Seed Science and Technology*, Zürich, v.23, n.1, p.183-192, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**, Brasília: SNTA/DNDV/CLV, 1992. 365p.
- CASTELLANI, E.D.; SILVA, A.; BARRETO, M. & AGUIAR, I.B. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. var. *variegata*. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.18, n.1, p.41-44, 1996.
- CHRISTENSEN, C.M. Microflora and seed deterioration. In: ROBERTS, E.H. **Viability of seeds**. Syracuse: Univ. Press, 1972. p.59-93.
- CHRISTENSEN, C.M. & KAUFMANN, H.H. Deterioration of stored grains by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.3, p.69-84, 1969.
- CUSTÓDIO, C.C.; MACHADO-NETO, N.B.; FOLINO, J.A. & CASEIRO, R.F. Efeito de um desinfetante natural, o extrato de sementes de grapefruit (kilo®) na desinfecção de sementes de *Panicum maximum* cv. "Tanzânia". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9, Florianópolis, 1995. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.5, n.2, p.103, 1995. (Resumos).
- ELLIS, M.A.; FOOR, S.R. & SINCLAIR, J.B. Dichloromethane: nonaqueous vehicle for systemic fungicides in soybean seeds. **Phytopathology**, St Paul, v.66, n.10, p.1249-1251, 1976.
- HARMON, G.G. & PFLEGER, F.L. Pathogenicity and infection sites of *Aspergillus* species in stored seeds. **Phytopathology**, St. Paul, v.64, n.10, p.1339-1344, 1974.
- HENNING, A.A. Testes de sanidade de sementes de soja. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. (eds.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill/ABRATES-COPASEM, 1987. p.441-453.
- HEWETT, P.D. Pretreatment in seed health testing. 2. Duration of hypochlorite pretreatment in the agar plate test for *Ascochyta* spp. *Seed Science and Technology*, Zürich, v.7, n.1, p.83-85, 1979.
- ISTA - International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology*, Zürich, v.4, n.1, p.51-177, 1976.
- 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.
- LIMA, E.F.; VIEIRA, R.M. & CARVALHO, J.M.F.C. Influência de *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger* e *A. flavus* na deterioração de sementes de algodoeiro armazenadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.3, p.555-560, 1984.
- LOPES, J.C.; JARDIM, I.C.C.; SOBREIRA, D.G.; FORDE, G.H.A. & TATAGIBA, J.S. Associação entre germinação, vigor e sanidade em sementes de milho precoce e normal, produzidos na área experimental do Centro Agropecuário da UFES. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 7, Campo Grande, 1991. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.1, n.4, p.55, 1991. (Resumos).
- MACHADO, J.C. & LANGERAK, C.J. Adequação do teste de sanidade ('blotter test') visando detecção de fungos em sementes de algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 8, Foz do Iguaçu, 1993. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.3, n.3, p.92, 1993. (Resumos).
- McLEAN, M.; DINI, M. & BERJAK, P. Contributions to the characterisation of the seed storage fungi: *Aspergillus versicolor* 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 fungicida e conservação de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.13, n.2, p.105-113, 1991.
- PAIVA, L.E.; LOBO-JR., M.; ÁVILA, Z.R.; MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A. & VIEIRA, M.G.G.C. Efeito de *Aspergillus flavus* sobre sementes de soja envelhecidas por diferentes períodos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9, Florianópolis, 1995. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.5, n.2, p.102, 1995. (Resumos).
- PEREIRA, E.B.C.; PAIVA, L.E.; PEREIRA, A.V.; CARVALHO, M.L.M.; CHAGAS, Z.A.; SOUZA, P.E. & ASSUNÇÃO, M. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de três cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), produzidas em três localidades no Brasil Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9, Florianópolis, 1995. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.5, n.2, p.130, 1995. (Resumos).
- PHIPPS, P.M. Soybean and peanut seed treatment: new developments and needs. **Plant Disease**, St Paul, v.68, n.1, p.76-77, 1984.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1979. 289p.
- RESENDE, J.C.F.; REIS, M.S.; ROCHA, V.S.; SEDIYAMA, T. & SEDIYAMA, C.S. Efeito da época de colheita e condição de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Revista Ceres**, Viçosa, v.43, n.245, p.17-27, 1996.

- SAUER, D.B. & BURROUGHS, R. Desinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, n.7, p.745-749, 1986.
- 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, 1981.
- TANAKA, M.A.S. & MACHADO, J.C. Patologia de sementes. **In-forme Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.123, p.40-46, 1985.
- TEIXEIRA, H.; MACHADO, J.C. & VIEIRA, M.G.G.C. Influência de *Colletotrichum gossypii* South. no desenvolvimento inicial do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em função da localização do inóculo e desinfestação das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.1, p.9-13, 1997.
- VECHIATO, M.H.; KOHARA, E.Y. & MENTEN, J.O.M. Efeito do armazenamento em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.204-208, 1994.
- VIDHYASEKARAN, P. The use of dichloromethane to incorporate fungicides into rice seeds for control of *Drechslera oryzae*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.8, n.3, p.357-362, 1980.
- YORINORI, J.T. Fatores que afetam os resultados dos testes de sanidade envolvendo incubação. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. (eds.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill/ABRATES-COPASEM, 1987. p.299-302.

