
MÉTODOS DE DETECÇÃO DO GÊNERO *Aspergillus* EM SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.) EM
270 DIAS DE ARMAZENAMENTO
DETECTION METHODS OF *Aspergillus* GENUS IN CORN SEEDS (*Zea mays* L.)
DURING 270 DAYS STORAGE

CIRIO¹, G. M.; LIMA², M. L. R. Z. C.

¹ Doutoranda em Produção Vegetal. Curso de Agronomia. Universidade Federal do Paraná.

² Professora Doutora. Curso de Pós-Graduação em Produção vegetal. Universidade Federal do Paraná.

RESUMO

O gênero *Aspergillus* tem como característica desenvolver-se em sementes e grãos com baixa umidade causando deterioração destes durante armazenamento com efeito na germinação nas sementes e produção de micotoxinas como aflatoxina em grãos, prejudiciais a saúde do homem e dos animais. Para avaliar a eficiência de métodos de detecção para *Aspergillus*, verificar germinação e umidade das sementes de milho foi feita armazenagem por 270 dias. As avaliações foram ao zero, 90, 150, 210 e 270 dias após armazenamento (DAA) com testes em papel filtro (blotter) e nos meios de batata dextrose ágar ácido (BDA ácido) e ágar suco de tomate mais 6% de cloreto de sódio (AST salino). Como resultados ao zero dia de armazenamento verificou-se ausência de *Aspergillus*; aos 90 DAA incidências 7,2% em blotter e 1,1% em AST; aos 150 DAA incidências 5,1% em blotter; aos 210 DAA incidências 41,1% em AST, 5,1% no blotter e 3,3% no BDA e aos 270 DAA incidências de 79,7% e 66,2% em blotter e AST que não diferiram estatisticamente entre si e 21% em BDA. A germinação e umidade foram: 98% e 10,8% (dia zero); 93% e 13,4% (90 DAA); 93% e 12,2% (150 DAA); 92% e 14,2% (210 DAA) e 36% e 12,2% (270 DAA), respectivamente. Concluiu-se que o meio AST salino mostrou maior eficiência para detectar *Aspergillus* aos 210 DAA indicando proliferação do gênero durante armazenamento até 270 DAA. A germinação das sementes reduziu-se de 92% para 36% entre 210 e 270 DAA e a umidade variou entre 10,8% e 14,2%, compatível com armazenagem segura.

Palavras-chave: fungos de armazenamento, sementes de milho, método blotter, meios de cultura, ágar suco de tomate, meio de batata dextrose ágar

ABSTRACT

The genera *Aspergillus* has a characteristic to developed in seeds and grains with low humidity causing deterioration during storage with effects on the seeds germination and micotoxins production as aflatoxin in grains that are harmful to man and animal health. To evaluated the efficiency of detection methods for *Aspergillus*, to confirm germination and humidity in maize seeds, they were stored for 270 days. The evaluations were at zero, 90, 150, 210 and 270 days after storage (DAS) with the blotter test and in media potato-dextrose-agar (PDA acid) and tomato juice agar plus 6% NaCl (salty TJA). As results at zero day absence of *Aspergillus*, at 90 DAS incidence 7,2% in blotter and 1,1% in TMA, at 150 DAS incidence 5,1% in blotter; at 210 DAS the incidence 41,1% in TMA, 5,1% in blotter e 3,3% in PDA and at 270 DAS incidence 79,7% and 66,2% in blotter and TMA that didn't differ statistically and 21% in PDA. Were get germination and humidity 98% and 10,8% (zero day); 93% and 13,4% (90 DAS); 93% and 12,2% (150 DAS); 92% and 14,2% (210 DAS) and 36% and 12,2% (270 DAS) respectively. The conclusions were that the media salty TJA showed higher efficiency to detect *Aspergillus* at 210 DAS what indicated proliferation of the genera during storage till 270 DAS. The germination reduced from 92% to 36% between 210 e 270 DAS and humidity remained between 10,8% and 14,2% compatible with secure storage.

Key-words: Storage fungi, maize seeds, blotter test, culture media, tomato juice agar, potato-dextrose-agar.

INTRODUÇÃO

Os produtos armazenados grãos e sementes podem ser o alvo preferido de alguns fungos pois servem como substratos apropriados ao desenvolvimento de algumas espécies. A associação de fungos às sementes pode afetar qualidade fisiológica da semente com redução da germinação e vigor e nos grãos podem desenvolver-se e liberar micotoxinas que causam intoxicações (micotoxicoses) nos animais e no homem (POPINIGIS, 1985; MENTEN, 1995; PEREIRA, 1995, MALOZZI e CORREA, 1998).

O gênero *Aspergillus* consta de fungos toxigênicos, causadores de deterioração em grãos e sementes, são saprófitos cosmopolitas de disseminação fácil por seus esporos leves

e secos. São xerofílicos ou xerotolerantes, ou seja podem crescer em baixo potencial de água, sendo os primeiros a se desenvolverem nas condições de baixa umidade dos grãos e sementes assim facilitando o desenvolvimento de outros gêneros que necessitam mais umidade (NEERGAARD, 1979; BERJAK, 1987; MILLS, 1983; GRIFFIN, 1994; LUZ, 1995; PUZZI, 2000).

A dificuldade do monitoramento da qualidade de sementes e grãos armazenados reside na precisão e exatidão quando a população é pequena mas que pode vir a contaminar todo o lote de sementes. Os fungos de armazenamento podem ser identificados pelo método do papel de filtro (blotter) que expressa a população fúngica da semente em presença apenas de umidade, combinando princípios *in vivo* e *in vitro*, permitindo a observação de fungos se desenvolvendo em condições naturais e podendo ser empregado para todas as sementes. É o mais utilizado pois permite número maior de repetições, não envolve trabalho de laboratório especializado, é teste relativamente simples e fornece visão ampla das condições fitossanitárias das sementes (ISTA, 1981; NEERGAARD, 1979, ONO *et al.*, 1996).

Meios de cultura agarizados como de batata-dextrose-ágar ácido (BDA) são recomendados por exercerem controle sobre a população bacteriana que possa estar nas sementes enquanto que ágar suco de tomate (AST) mais 6 % de cloreto de sódio é recomendado para a detecção de fungos de armazenamento devido a particularidade do gênero *Aspergillus* em crescer em meios de alta concentração osmótica obtida pela adição de sal ou sacarose que também exercem efeito inibitório ao desenvolvimento de outros fungos, além da vantagem das sementes não germinarem facilitando a identificação de fungos em exame de sementes inteiras (NEERGAARD, 1979; BERJAK, 1987, WETZEL, 1987).

A desinfestação de sementes com hipoclorito é procedimento essencial pois o objetivo dos testes é a determinação das condições em que as sementes foram armazenadas verificando-se os fungos internos às sementes ou grãos (NEERGAARD, 1979; SAUER e BURROUGHS, 1986; MAUDE, 1996; DINGRA e ACUÑA, 1997).

O período de armazenamento de sementes tem variação entre 6 e 8 meses, intervalo de tempo em que o gênero *Aspergillus* pode se desenvolver em condições de umidade mais baixas nas sementes; o que torna necessário monitorar a sua presença por testes a serem conduzidos no início, durante e ao final do armazenamento com objetivo de determinar a sua presença e tomar providências necessárias para sua manutenção (WETZEL, 1987).

Neste trabalho estabeleceu-se como objetivo utilizar testes de sanidade por incubação em papel filtro (Blotter) e nos meios de cultura de ágar-batata-dextrose ácido (BDA ácido) e ágar suco de tomate salino (AST salino) para detectar o gênero *Aspergillus*. As determinações foram feitas aos 90, 150, 210 e 270 dias após armazenamento (DAA) com determinação ainda de germinação e umidade das sementes de milho nos mesmos períodos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas sementes de milho híbrido submetidas a 270 dias de armazenamento em sacos de papel Kraft multifoliado, com os uso de testes de sanidade:

Incubação em papel filtro (blotter) de 75 sementes esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio (2%), enxaguadas em água estéril e distribuídas em gerbox plástico com três folhas de papel filtro umedecido com água, em câmara de fluxo laminar, com três repetições. As sementes foram colocadas sob iluminação, fotofase 12 horas, à temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) por um período de 7 dias sendo feitas a identificação morfológica e

quantificação, em percentual, do gênero *Aspergillus*.

Incubação nos meios de batata-dextrose-ágar (BDA ácido) e ágar suco de tomate mais 6% de NaCl (AST salino) de 45 sementes (para cada meio de ágar) distribuídas em placas de petri de 15 cm de diâmetro pela metodologia descrita por BERJAK (1987) com modificações. As sementes foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito a 2% enxaguadas em água estéril e dispostas em meio de BDA autoclavado e acrescido de 16 mL de ácido láctico a 85% e em AST mais 6% de NaCl. As sementes foram colocadas sob iluminação, fotofase 12 horas, à temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) por um período de 7 dias sendo feitas a identificação morfológica e quantificação, em percentual do gênero.

A percentagem de germinação foi avaliada de acordo com as Regras de Análise de Sementes utilizando-se 400 sementes distribuídas em quatro repetições de 50 sementes com avaliação ao 7º. dia e determinação da umidade pelo método da estufa à $103^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas (BRASIL, 1992).

Os testes iniciais ao armazenamento foram pelo blotter e BDA e de germinação e umidade das sementes. Aos 90, 150, 210 e 270 dias após armazenamento (DAA) foram feitos teste blotter e nos meios de cultura de BDA ácido e meio AST salino e de germinação e umidade.

Os dados foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizados com três tratamentos, três repetições e quatro tempos de armazenamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo Teste de Bartlett quanto à homogeneidade. As variáveis cujas variâncias mostraram-se homogêneas tiveram os tratamentos avaliados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Para análise dos dados, foi utilizado programa estatístico MSTAT-C, versão 2.11

RESULTADOS

As incidências de *Aspergillus* em sementes durante armazenamento podem ser verificados pela TABELA1.

Na avaliação dos fungos presentes nas sementes de milho nos testes preliminares (zero DAA) não foi constatado o gênero *Aspergillus* pela metodologia utilizada, pois este gênero normalmente não invade sementes antes da colheita.

Nas avaliações aos 90 e 150 DAA os resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias não permitiram a realização da análise de variância e conseqüente teste de comparação de médias, isto foi devido, principalmente, ao grande número de observações com valores nulos. Deste modo foram feitas considerações levando-se em conta somente as incidências médias de fungos em sementes, não sendo observadas diferenças entre os métodos de detecção (blotter, BDA ácido e AST salino). Os resultados obtidos foram incidências médias do gênero *Aspergillus* pelo teste do blotter de 7,2 % e 5,1 % e em AST salino de 1,1% e zero, respectivamente. Em BDA ácido não foi constatada a incidência do patógeno-alvo nas sementes. O gênero *Aspergillus* não foi constatado ao início do armazenamento, no entanto foi constatada baixa presença aos 90 e 150 DAA. Este gênero pode ser encontrado em sementes recém colhido em baixas porcentagens, em torno de 1,1% (KENNEDY, 1979; WETZEL, 1987).

Aos 210 DAA, o resultado do teste de comparação de médias, mostrou o meio de AST salino detectando a percentagem de 41,1 % do patógeno-alvo, nas sementes caracterizando este meio como o melhor para a detecção do gênero, resultado que coincide

com a recomendação de NEERGAARD (1979); BERJAK (1987); WETZEL (1987) de uso de meios de cultura com considerável concentração de sal ou açúcar. Neste período foram encontrados os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* sobre uma mesma semente, para fins de avaliação considerou-se a incidência do gênero dominante na região da camada negra da cariopse (WETZEL, 1987). Em meio ácido de BDA e pelo blotter, as incidências foram de 3,3 % e 5,1 %, que não diferem estatisticamente entre si e apresentaram o meio AST salino como o superior.

TABELA 1- Porcentagem de incidência do gênero *Aspergillus* em sementes de milho em meios de BDA ácido e AST salino e Blotter e de germinação e umidade. Resultados preliminares e aos 90, 150, 210 e 270 dias após armazenamento (DAA).

DAA	MÉTODOS			Germinação (%)	UMIDADE (%)
	BDA ¹	AST ²	BLOTTER ³		
zero	0,0 ⁴	-	0,0	98	10,8
90	0,0	1,1	7,2	93	13,4
150	0,0	0,0	5,1	93	12,2
210	3,3 B ⁵	41,1 A	5,1 B	92	14,2
270	21,0 B	66,2 A	79,7 A	36	12,2

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar ácido

² AST- Ágar Suco de Tomate mais 6% de NaCl

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Porcentagem média de incidência de *Aspergillus* em sementes de milho

⁵ Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas (nas linhas) não diferem entre si a Tukey 5 %.

Aos 270 DAA, o teste de homogeneidade das variâncias mostrou a necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada de $x + 1$, sendo x a porcentagem de sementes infestadas com fungos, onde se verificou a incidência do gênero *Aspergillus* de 66,2 % em AST salino e 79,7 % em blotter que não diferiram entre si e diferentes de meio ácido de BDA ácido, onde foram verificadas 21 % das sementes com incidência do gênero.

Considerando as incidências de *Aspergillus* nas sementes, os resultados verificados aos 210 DAA de 41,1% de fungos podem servir como indicativo de possíveis perdas na capacidade germinativa das sementes na continuidade da armazenagem. Entre os organismos que ocasionalmente podem provocar danos na capacidade germinativa de sementes armazenadas esta incluído o gênero *Aspergillus* (PEREIRA, 1995).

A germinação inicial (zero DAA) das sementes foi de 98 %, sendo que aos 90, 150 e 210 DAA foram obtidos os valores de 93, 93 e 92%. As sementes podem deteriorar-se quando armazenadas em condições ambientais, sem controle de temperatura e umidade. Foi verificada redução na porcentagem de germinação mais acentuada depois de 210 DAA quando se obteve 36% de germinação aos 270 DAA. VON PINHO *et al.* (1995) obtiveram as menores porcentagens médias de germinação em sementes a qual foi atribuída a alta incidência conjunta de fungos como *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Quanto à umidade das sementes, ao início do armazenamento obteve-se 10,8 % e com variações de 13,4; 12,2; 14,2 e 12,2 %, nos quatro períodos posteriores. Para o armazenamento de sementes de milho sem risco de deterioração por períodos de até um ano, a umidade deve ficar entre 13 e 14 %. As alterações de umidade em sementes podem ser atribuídas ao metabolismo dos próprios fungos assim como sua higroscopicidade e a ação simples ou combinada da umidade mais o efeito nocivo dos fungos pode afetar a

germinação de sementes (MORENO-MARTINEZ *et al.*, 1985).

CONCLUSÕES

Durante o período de 270 dias de armazenamento foi verificada infestação fúngica nas sementes de milho pelo gênero *Aspergillus*, sendo possível detectá-los com eficiência pelo uso de diferentes métodos de incubação.

O gênero *Aspergillus* foi mais bem detectado no meio de cultura ágar suco de tomate mais 6% de cloreto de sódio (AST salino) propiciando sua detecção aos 210 DAA.

Nas sementes de milho armazenadas verificou-se redução da porcentagem de germinação acentuada entre os 210 DAA e 270 DAA de 925 para 36%.

Durante o período de armazenamento de 270 dias as sementes alteraram a umidade sendo estes valores compatíveis com a armazenagem segura.

REFERÊNCIAS

1. BERJAK, P. - *Stored seeds: The problems caused by micro-organisms (with particular reference to the Fungi)*. IN: NASSER, L. C.; WETZEL, M. M. e FERNANDES, J. M. *Advanced International Course on Seed Pathology*, Passo Fundo. ABRATES, 1987, p.38-50.
2. BRASIL, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para Análise de Sementes. Brasília, 1992, 365p.
3. CARVALHO, N. N.; NAKAGAWA, J. - Sementes, Ciência, Tecnologia e Produção. Campinas. Fundação CARGILL. 1983. 429 p.
4. DINGRA, O. D., ACUÑA, R. S. - Patologia de sementes de soja. Viçosa: UFV, 1997. 119p.
5. GRIFFIN, H. D. - *Fungal physiology*. 2ª.Ed. John Wiley & Sons, 1994.
6. ISTA-INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. *Handbook on seed testing*. Zurich : *Working sheets, Section 2*, 1981.
7. KENNEDY, B.W. - *The occurrence of Aspergillus spp on stored seeds*. IN: *Seed Pathology*. IAPAR, 1979. p. 257-261.
8. LUZ, W. C. - Diagnose e controle de doenças da espiga de milho no Brasil. Circular Técnica. Centro Nacional de Pesquisa do Trigo, Passo Fundo. n.5, p.1-2, 1995.
9. MALLOZZI, M.A. B., CORREA, B. - Fungos toxigênicos e micotoxinas. Bol. Técn. Inst. Biol., São Paulo, n.2, p.5-26, jul.1998
10. MAUDE, R.B. - *Seed borne diseases and their control - Principles and practices*. CAB International, 1996. 280P.
11. MENTEN, J. O. M. - Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. IN: Patógenos em Sementes: Detecção, danos e controle químico. São Paulo, CibaAgro, 1995. p. 115-136.
12. MILLS, J. T. - *Insects-fungus associations influencing seed deterioration*. *Phytopathology*. St. Paul. v. 73, n. 2, p. 330-335, 1983.
13. MORENO-MARTINEZ, E. *et al.* - *Use of fungicides for corn seed viability preservation*. *Seed, Science & Techonology*. v.13, p. 235-241. 1985.
14. NEERGAARD, P. - *Seed Pathology*. London: Macmillan, 1979. 839 p.
15. ONO, E. Y. S. *et al.* - Microbiota fúngica em amostras de milho da Região Sul do Paraná. IN: Congresso de Milho e Sorgo, 1996.
16. PEREIRA, G. A. *et al.* - Fungos de armazenamento em lotes de sementes descartados no Estado de Minas Gerais na safra 1989/90. Revista Brasileira de Sementes. Brasília, v. 16, n.2, p. 217-219, 1994.
17. PEREIRA, O. P. - Tratamento de sementes de milho no Brasil. IN: Patógenos em sementes: Detecção, danos e controle químico. São Paulo. CibaAgro, 321p. 1995.
18. PUZZI, D. - Abastecimento e Armazenagem de Grãos. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 2000. 660p.
19. POPINIGIS, F. - Fisiologia da semente. 2ª Ed. Brasília, 1985. 289p.
20. SAUER, D. B.; BURROUGHS, R. - *Disinfections of seed surfaces with hypochlorite*. *Phytopathology*. St. Paul, v. 76, n. 7, p. 745-749, 1986.
21. VON PINHO, E. V. R.; CAVARIANI, C.; ALEXANDRE - Efeitos do tratamento fungicida sobre qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho (*Zea mays*, L.). Revista Brasileira de Sementes. Brasília, v. 17, n. 1, p.23-8, 1985.
22. WETZEL, M.M.V.S. - Fungos de Armazenamento. IN: Patologia de Sementes. Ed. Jacinto Soave e Maria Magaly Velloso da Silva Wetzell. Campinas. Fundação CARGILL, 1987. p. 562-568.