

Ocorrência de microrganismos e sua relação com a qualidade fisiológica de sementes de alface**Occurrence of microorganisms and their relationship with physiological quality of lettuce seeds**

DOI:10.34117/bjdv6n11-424

Recebimento dos originais: 19/10/2020

Aceitação para publicação: 19/11/2020

Cristina Batista de Lima

Profs. Associados

Universidade Estadual do Norte do Paraná-Campus, Luiz Meneghel (UENP/CLM); Centro de Ciências Agrárias; Setor de produção Vegetal; BR369, Km54, CP261, CEP86360-000; Bandeirantes - PR.
crislima@uenp.edu.br

João Tavares Bueno

Profs. Associados

Universidade Estadual do Norte do Paraná-Campus, Luiz Meneghel (UENP/CLM); Centro de Ciências Agrárias; Setor de produção Vegetal; BR369, Km54, CP261, CEP86360-000; Bandeirantes - PR.
tavares@uenp.edu.br

Júlio César Altizani Júnior

Graduando em Agronomia

Universidade Estadual do Norte do Paraná-Campus, Luiz Meneghel (UENP/CLM); Centro de Ciências Agrárias; Setor de produção Vegetal; BR369, Km54, CP261, CEP86360-000; Bandeirantes - PR.
jr.altizani@hotmail.com

Guilherme Augusto Shinozaki

Mestrando em Agronomia

Universidade Estadual do Norte do Paraná-Campus, Luiz Meneghel (UENP/CLM); Centro de Ciências Agrárias; Setor de produção Vegetal; BR369, Km54, CP261, CEP86360-000; Bandeirantes - PR.
guilherme_shinozaki@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a relação entre microrganismos e, a qualidade fisiológica de lotes comerciais de sementes de alface. Foram utilizados nove lotes comerciais de sementes de alface submetidos a avaliação da qualidade fisiológica e sanitária. As análises da qualidade fisiológica foram determinação do teor de água, teste de germinação, primeira leitura da germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas em substrato e no solo. Para a análise sanitária foram utilizadas as metodologias: Blotter test, plaqueamento em meio semi-seletivo e identificação bacteriana por meio de teste bioquímico para oxidase positiva. Para avaliar as consequências da presença do microrganismo de maior incidência, sobre o potencial germinativo dos lotes, as sementes foram inoculadas com *Pseudomonas* spp. e submetidas ao

teste de germinação. Foram identificados os gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Pseudomonas*. A multiplicação e potencial de redução da germinação dos lotes, pelos microrganismos identificados, esteve intrinsecamente relacionada ao nível de deterioração pré-existente dos lotes, portanto, os microrganismos não provocaram danos ao potencial germinativo dos lotes de maior vigor.

Palavras-chave: contaminação de sementes, germinação, *Lactuca sativa* L., qualidade sanitária, vigor.

ABSTRACT

The objective of this work was to verify the relationship between microorganisms and physiological quality of commercial lettuce seed lots. Nine commercial batches of lettuce seeds used and submitted to physiological and sanitary quality assessment. Analyzes of physiological quality were determination of water content, germination test, first germination reading, accelerated aging, emergence of seedlings in substrate and in soil. For the sanitary analysis, the following methodologies used Blotter test, plating in a semi-selective medium and bacterial identification by means of a biochemical test for positive oxidase. To evaluate the consequences of presence the microorganism with the highest incidence on germinate potential of lots, the seeds inoculated with *Pseudomonas* spp. and submitted to germination test. The genera *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* and *Pseudomonas* identified. The multiplication and reduction potential of germination the batches, by identified microorganisms, was intrinsically related to level of pre-existing deterioration of batches, therefore, the microorganisms didn't cause damage to germinate potential the batches of greater vigor.

Keywords: seeds contamination, germination, *Lactuca sativa* L., health quality, seed vigor.

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa de maior importância econômica, nutricional e social no Brasil (SILVA JÚNIOR et al., 2011). Sua propagação é realizada por meio de sementes, sendo que, a uniformidade na emergência de plântulas e, o estabelecimento de plantas no campo de cultivo dependem de sementes com elevada qualidade comercial (NASCIMENTO, 2011). Sementes de alface com boa qualidade fisiológica originam mudas vigorosas que atingem o ponto para transplântio em menor tempo, as plantas apresentam maior número de folhas, altura da parte aérea, comprimento de raízes e massas das matérias fresca e seca (CECCHERINI et al., 2018).

A qualidade fisiológica das sementes é uma característica influenciada por fatores como potencial germinativo e teor de água, que, por sua vez, são determinados pelas condições climáticas durante o cultivo e maturação, vigor da planta-mãe, danos mecânicos, condições de secagem, umidade relativa e temperatura do ar durante o armazenamento, incidência de insetos e microrganismos (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012). Os Microrganismos podem se associar as sementes e reduzir a expressão do potencial genético da cultivar e diminuir o estabelecimento de plântulas.

As sementes representam potenciais locais de abrigo e veículos de disseminação para microrganismos que, ao continuar seu ciclo biológico após a semeadura, podem provocar ou aumentar o desenvolvimento de doenças a campo (NASCIMENTO, 2011). Dessa forma, a inter-relação entre sementes e microrganismos é preocupante, uma vez que podem iniciar ou intensificar mecanismos de deterioração das sementes, durante o armazenamento (FINCH-SAVAGE e BASSEL, 2016). Contudo, a “sanidade total” nem sempre é possível, uma vez que a qualidade sanitária das sementes é influenciada pelas condições climáticas sob as quais foram produzidas e armazenadas (NASCIMENTO, 2011).

O teste rotineiro de análises de sementes é o de germinação, entretanto, seus resultados podem superestimar o real potencial fisiológico dos lotes, uma vez que, as sementes são colocadas para germinar sob condições assépticas com rigoroso controle de temperatura e umidade, conforme a espécie vegetal que está sendo avaliada (KIKUTI e MARCOS FILHO, 2012). Neste contexto, aplicar testes de vigor em conjunto com o teste de germinação, possibilita estimar o comportamento das sementes no armazenamento e, após a semeadura no campo. É interessante incluir entre os procedimentos de rotina, testes de sanidade visando determinar o potencial fisiológico e, os motivos que influenciaram no resultado obtido.

A literatura científica disponível é escassa sobre a ocorrência de microrganismos em sementes de alface, como por exemplo, o trabalho de BRUNO et al. (1990) que realizaram um estudo com o objetivo de conhecer os microrganismos, associados a sementes de oito espécies olerícolas cultivadas na Paraíba. Com base no exposto, o presente estudo teve por objetivo verificar a relação entre microrganismos e, qualidade fisiológica em sementes de alface.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Fitopatologia e Análise de Sementes do Campus Luiz Meneghel, da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP/CLM), em Bandeirantes. Os tratamentos foram constituídos por nove lotes comerciais de sementes de alface crespa, adquiridos de empresa registrada, categoria S2, isentos de tratamentos sanitários, em embalagens hermeticamente fechadas. A pesquisa foi conduzida em três etapas: qualidade fisiológica, qualidade sanitária e possíveis danos causados a capacidade germinativa das sementes, pela ação do patógeno de maior incidência.

Na primeira etapa, as sementes foram submetidas às seguintes análises:

a) Teor de água (%) - realizado pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 horas (Brasil, 2009a), empregando-se duas subamostras com 2 g de sementes por lote. Os resultados foram expressos em percentual, sem análise estatística, servindo para caracterização inicial dos lotes.

b) Teste de germinação - amostras de 200 sementes de cada lote (distribuídas em quatro repetições de 50 sementes) foram distribuídas equidistantes, sobre duas folhas de papel filtro, previamente umedecidas com água destilada na quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco, acondicionados em recipientes plásticos transparentes mantidos a 20 °C (BRASIL, 2009a). As avaliações foram realizadas aos quatro e sete dias após a instalação, registrando-se o percentual de plântulas normais (com radícula e cotilédones aparentes).

c) Primeira leitura do teste de germinação - considerando-se o percentual de plântulas normais obtidas no quarto dia, após instalação do teste de germinação (BRASIL, 2009a).

d) Envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl (76% UR) - conduzido com 200 sementes de cada lote, distribuídas em telas de arame suspensas, acopladas em recipientes plásticos transparentes, contendo 40 mL de solução salina (32 g de NaCl dissolvidos em 100 mL de água). Os recipientes foram mantidos a 41°C durante 48 horas e, ao final deste período, as amostras que apresentaram contaminação por fungos foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio 1% e, enxaguadas com água destilada. Após o envelhecimento acelerado o percentual germinativo foi verificado pelo teste de germinação.

e) Emergência de plântulas em substrato - as sementes foram semeadas individualmente em células de bandejas plásticas, previamente preenchidas com substrato comercial Tropstrato[®] e, mantidas sob bancada telada, dentro de estufa plástica modelo arco. Foram utilizadas quatro repetições com 72 sementes por lote, sendo que cada lote foi semeado em uma bandeja de 288 células. A irrigação diária foi feita por nebulização pela manhã e à tarde, mantendo-se uma lâmina d'água de 5 mm. A contagem de plântulas emersas, com cotilédones expandidos, foi realizada diariamente durante 30 dias após a semeadura.

f) Emergência de plântulas em solo - repetiu-se o procedimento descrito para emergência de plântulas em substrato, substituindo-se o substrato comercial por solo de barranco coletado na área da fazenda escola da UENP/CLM, que apresentou como características químicas os valores: pH 5,5 em CaCl₂, condutividade elétrica 0,05 mS cm⁻¹, matéria orgânica 40,3 g kg⁻¹, P 121 mg dm⁻³, K 1,2 cmolc dm⁻³, Ca 6,6 cmolc dm⁻³, Mg 14,7 cmolc dm⁻³, H+Al 3,3 cmolc dm⁻³, SB 9,7 cmolc dm⁻³, CTC 13 cmolc dm⁻³, V(%) 74,8. Para as características físicas os resultados foram: densidade úmida 1274,9 kg m⁻³, densidade seca 1108,4 kg m⁻³, umidade atual 13,1%, porosidade total 70,1%, espaço de aeração 7,8%, água facilmente disponível 11,5%, água tamponante 11,5%, água remanescente 39,3% e capacidade de retenção de água sob sucção de 10, 50 e 100 cm de coluna de água determinada em base volumétrica, respectivamente 62,3%, 50,8% e 39,3%.

Na segunda etapa avaliou-se a qualidade sanitária das sementes, visando detectar a presença de fungos e bactérias. Com relação aos fungos, utilizou-se o método da incubação em substrato papel filtro, no qual amostras de 200 sementes de cada lote (distribuídas em oito repetições de 25 sementes) foram distribuídas sobre três folhas de papel filtro umedecidas em água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, mantidas por 24 horas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e transferidas para a temperatura de -20°C por 24 horas. Após esses procedimentos as sementes permaneceram durante cinco dias sob fotoperíodo de 12 horas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (BRASIL, 2009b). A identificação dos fungos, após o período de incubação foi efetuada com base em suas características morfológicas, por meio de um microscópio estereoscópico e ótico.

Para verificar a presença de bactérias utilizou-se o meio semi-seletivo para gram-negativas (McConkey) e, o meio não seletivo ágar nutriente. O extrato de sementes foi obtido pela imersão de 200 sementes de cada lote, em 2 mL de água destilada durante 2 horas, a seguir as sementes foram retiradas, preparando-se desta forma um extrato de sementes para cada lote. Na sequência foi realizado o plaqueamento em meio contendo ágar nutriente e, em meio e McConkey. Após a formação das colônias foi feito o esfregão em lâminas contendo solução salina estéril e em soluções de cristal violeta, lugol 1%, álcool acetona e safranina 30 ppm, durante um minuto. A avaliação foi realizada contando-se o número de colônias bacterianas típicas e, o resultado expresso qualitativamente. Para identificar o gênero da bactéria encontrada utilizou-se o teste bioquímico do kit comercial para oxidase positiva BAC-TRAY III®.

As sementes utilizadas nos procedimentos para detecção de fungos e bactérias foram previamente desinfestadas, por meio de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante três minutos. As placas de Petri (15 cm de diâmetro) e o papel filtro foram previamente esterilizados (BRASIL, 2009b). Os dados obtidos foram apresentados em percentual de incidência de patógenos.

Na terceira etapa, amostras de sementes de todos os lotes foram inoculadas com a bactéria *Pseudomonas* spp., detectada no final do procedimento de isolamento e identificação bacteriana. Para tanto, amostras de 200 sementes de cada lote, distribuídas em oito repetições de 25 sementes, colocadas dentro de tubos de ensaio previamente esterilizados, contendo meio de cultura ágar nutriente, sendo a concentração de células microbianas ajustadas pela escala 10 de McFarland, aproximadamente $3,0 \times 10^9$ UFC/mL, permanecendo em contato com o meio durante 30 minutos. Após a inoculação as sementes foram avaliadas pelo teste de germinação (BRASIL, 2009a).

Em todas as etapas utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos em cada teste foram submetidos à análise de variância e, as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. As análises foram realizadas com o software estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2019). Os valores em percentual da incidência de patógenos foram transformados para arco seno $(x/100)^{1/2}$ e, os dados das variáveis com algum valor igual à zero, para $y = x + 0,01$. O grau de associação entre os resultados foi analisado pela técnica de correlação simples de Pearson (r).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água dos lotes analisados variou de 7,1 a 8,5% (Tabela 1), sendo coerente com os níveis de umidade recomendado para o armazenamento de sementes ortodoxas, como as de alface. Conforme CARVALHO e NAKAGAWA (2012), valores superiores a 12% podem reduzir os percentuais de germinação destas sementes. Segundo MARCOS FILHO (2015), o teor de água da semente é uma característica estritamente associada à deterioração e, de modo geral, estas sementes devem ser mantidas com 10 a 13%, porém, no caso das hortaliças onde o armazenamento é efetuado com embalagens impermeáveis, o grau de umidade pode ser reduzido para 5,0 a 7,0%. No presente estudo, o percentual de umidade dos lotes de sementes analisados permaneceu dentro do indicado para o armazenamento de sementes ortodoxas (inferior a 10%) e, portanto, abaixo do que seria um provável meio favorável para desencadear processos de deterioração e/ou proliferação de microrganismos.

Os percentuais de germinação dos lotes, informados nos rótulos das embalagens (Tabela 1) foram superiores a 80%, ou seja, porcentagem mínima exigida para comercialização de sementes de alface no Brasil (BRASIL, 2012). Entretanto, apenas alguns lotes corresponderam a tais percentuais nos testes de primeira leitura da germinação (lotes 1, 2, 3, 8 e 9), germinação em laboratório (lotes 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 9), envelhecimento acelerado com solução salina de NaCl (lotes 1, 2 e 3) e emergência de plântulas tanto no substrato comercial, quanto no solo (lotes 1, 2, 3 e 8).

Os lotes 4, 5, 6 e 7 foram os que apresentaram menores percentuais de vigor pelo teste de envelhecimento acelerado, entretanto, os lotes 4 e 6 apresentaram bom desempenho no teste de germinação (Tabela 1), porém, os resultados da primeira leitura do teste de germinação e do teste de germinação, não apresentaram correlação forte, ou seja, maior que 0,7 (DANCEY e REIDY, 2006) com o teste de envelhecimento acelerado, escolhido como um teste indicativo do vigor, ou seja, da real condição fisiológica dos lotes estudados. Este resultado corrobora com o descrito por NASCIMENTO (2011), em que lotes com germinação semelhante podem

diferir quanto ao percentual de emergência de plântulas, nível de deterioração e vigor, pois, a diminuição do potencial germinativo de um lote é a última consequência do processo de deterioração. Os resultados dos demais testes utilizados demonstraram correlações fortes, positivas e altamente significativas (Tabela 1), o que confere segurança às interpretações sobre a viabilidade e vigor dos lotes analisados.

Tabela 1. Percentuais médios de germinação informado nos rótulos das embalagens (GR), do teor de água (TA) e de plântulas normais verificados nos testes de primeira leitura da germinação (PLG), germinação em laboratório (GE), envelhecimento acelerado com solução salina de NaCl (EAS), emergência de plântulas em substrato (EPSU), emergência de plântulas em solo (EPSO) e coeficientes de correlação (r) entre os testes de análise da qualidade fisiológica de nove lotes de sementes de alfafa. UENP-CLM, Bandeirantes/PR, 2020.

Lotes	GR	TA	PLG	GE	EAS	EPSU	EPSO
1	97	7,6	91,0 a	96,0 a	96,5 a	86,8 a	88,5 a
2	87	7,1	96,0 a	97,0 a	97,0 a	97,9 a	84,6 a
3	99	8,5	76,0 a	82,0 a	93,5 a	81,6 a	89,9 a
4	94	8,0	53,0 b	87,5 a	54,0 c	65,6 b	38,2 b
5	98	8,4	25,5 c	39,0 c	54,5 c	59,4 b	8,7 d
6	94	8,0	63,0 b	85,5 a	33,6 e	13,5 c	7,6 d
7	82	8,3	37,0 c	55,0 b	31,5 e	17,4 c	24,0 c
8	89	8,0	88,0 a	92,0 a	72,5 b	86,1 a	90,6 a
9	84	8,0	87,0 a	88,0 a	45,0 d	68,8 b	20,5 c
CV(%)			17,8	12,5	14,3	16,8	17,6
Correlação (r)							
	EPSO	0,767**	0,704**	0,724**	0,915**	-----	
	EPSU	0,905**	0,810**	0,709**	-----		
	EAS	0,601**	0,521**	-----			
	GE	0,976**	-----				

Médias seguidas por mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%; CV= coeficiente de variação; ** = significativo a 1%.

Todos os lotes apresentaram incidência de microrganismos, sendo identificados três gêneros de fungos: *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. e, o gênero bacteriano *Pseudomonas* spp. (Tabela 2). *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp. foram encontrados em menor frequência variando entre 0,5 a 13% entre os lotes. Os lotes 4, 5, 6 e 7 foram os que apresentaram os maiores índices de incidência bacteriana com percentuais próximos a 100%.

O lote 9 apresentou maior incidência fúngica com 65,5%, na soma dos três gêneros, com destaque para a ocorrência de *Aspergillus* spp. com 43,5%. Os lotes 1, 2 e 3 demonstraram os menores percentuais de contaminação total variando entre 13% (lote1) a 39,7% (lote 3).

Um elevado percentual de contaminação por microrganismos em sementes de alface também foi observado por BRUNO et al. (1990), que identificaram seis gêneros de fungos, entre os quais estão os três gêneros encontrados no presente estudo. Considerando-se que no referido trabalho, as amostras de sementes foram coletadas no ano de 1983, em diferentes municípios da Paraíba provenientes de olericultores, instituições oficiais e postos de revenda de produtos agrícolas, é possível inferir que, a associação destes microrganismos com sementes de alface, ocorre de modo generalizado no Brasil, a aproximadamente 40 anos.

Os gêneros *Aspergillus* sp. e *Cladosporium* sp. são considerados comuns na microflora de sementes durante o armazenamento. *Cladosporium* sp. é um fungo patogênico e pode ser transmitido das sementes para as plântulas. *Aspergillus* têm a capacidade de reduzir o poder germinativo da semente e causar a morte do embrião, além disso, esses fungos têm sua incidência aumentada em condições de armazenamento inadequado (BHAJBHUJE, 2014). O gênero *Aspergillus* sp. se associam às sementes durante a maturação e após a colheita, atuando quando a umidade relativa do ar supera 80%, e o teor de água nas sementes é superior a 14% (MARCOS FILHO, 2015). Os resultados do trabalho de PAIVA et al. (2016) indicaram a presença do gênero *Aspergillus* spp. entre outros em sementes de alface e, concluíram que a sanidade dos lotes não foi satisfatória, nos testes realizados em condições de laboratório.

Os fungos do gênero *Alternaria* são considerados fungos de campo, pois, contaminam as sementes durante o cultivo e, sua proliferação ocorre apenas sob condições incompatíveis com a conservação de sementes ortodoxas, ou seja, em sementes com teor de água acima de 30% e, umidade relativa do ar superior a 95% (MARCOS FILHO, 2015). Entretanto, de acordo com TÖFOLI et al. (2015), o gênero *Alternaria* possui espécies patogênicas com conídios resistentes a baixos níveis de umidade, viáveis por até dois anos nestas condições, podendo ocasionar o tombamento de plântulas, necrose do cotilédone e hipocótilo e, a disseminação de doenças em novas áreas de produção. Em plantas adultas os sintomas da alternariose caracterizam-se por manchas necróticas em folhas, pecíolos, flores e inflorescência. Conforme JAJOR et al. (2012), fungos do gênero *Alternaria* influem decisivamente na qualidade final das sementes, por expressar microtoxinas que prejudicam o desenvolvimento fisiológico. Sendo assim, ainda que não causem prejuízos diretos as sementes de alface, estes fungos não são aceitáveis, pois, podem provocar danos significativos no campo de produção de hortaliças.

Ao verificar a correlação entre os percentuais de microrganismos e os resultados dos testes de qualidade fisiológica (Tabela 2), observa-se que a incidência de *Aspergillus* não apresentou correlação significativa com nenhum teste, enquanto que, *Alternaria* spp. teve correlação significativa somente com o teste de envelhecimento acelerado, porém, o valor de tal correlação, pode ser considerado como fraco, isto é menor que 0,7 (DANCEY e REIDY, 2006).

As médias do gênero *Cladosporium* spp. apresentaram correlações positivas e significativas com três testes, entretanto, tais correlações não podem ser consideradas como fortes (maiores que 0,7) e, portanto, possuem baixa probabilidade de realmente ocorrerem em ambiente de armazenamento ou campo (DANCEY e REIDY, 2006). O fato de não ter sido observada nenhuma correlação importante entre o percentual de incidência dos fungos e, os testes de avaliação da qualidade fisiológica (Tabela 2), corrobora com o descrito no trabalho de NELSON (2018) ao mencionarem que as sementes abrigam diversificada flora microbiana, sendo um dos principais meios de disseminação e manutenção da viabilidade dos fungos, devido aos seus teores de proteínas, carboidratos e minerais, o que facilita a colonização dos tecidos, estendendo-se até os primeiros estádios do desenvolvimento das plântulas.

Lotes de sementes com incidência de microrganismos, conforme FINCH-SAVAGE e BASSEL (2016), podem apresentar percentuais de germinação dentro dos padrões estabelecidos para comercialização, favorecendo a sobrevivência e disseminação do fungo, com os danos sendo visíveis apenas em condições de campo, quando poderão reduzir o percentual de emergência de plântulas. Resultado semelhante, ao descrito pelos referidos autores foi observado no presente estudo nos lotes 4, 6 e 9 (Tabela 1). Segundo PARISI et al. (2016), os fungos associados a sementes podem permanecer latentes, sem causar sintomas, até que as condições de estresse iniciem o processo de deterioração, propiciando um ambiente favorável para a proliferação de fungos, o que acelera sua deterioração.

O gênero *Pseudomonas* spp. foi observado em todos os lotes, com maior frequência nos lotes 4, 5, 6 e 7 (Tabela 2). Este resultado coincide com o relatado por Bruno et al. (1990), que quantificaram a presença de 85,5% de colônias bacterianas não identificadas em sementes de alface. Conforme FRANK et al. (2017) a contaminação superficial é o meio de transporte preferido pelo gênero *Pseudomonas* e, sementes aparentemente sadias podem carregar bactérias de ampla longevidade que passam despercebidas nas amostragens, maximizando a probabilidade de infecção na progênie futura.

As correlações entre *Pseudomonas* spp. e os resultados dos lotes 4, 5, 6 e 7 nos testes de qualidade fisiológica foram fortes, negativas e altamente significativas (Tabela 2), indicando

haver relação entre o potencial fisiológico dos lotes e a incidência bacteriana, ou seja, a medida que aumenta a proliferação das bactérias, o vigor dos lotes é reduzido.

Tabela 2. Percentuais médios de incidência de patógenos identificados em nove lotes de sementes de alface e, seus coeficientes de correlação (r) com os resultados dos testes para a análise da qualidade fisiológica. UENP-CLM, Bandeirantes/PR, 2020.

Lote	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Alternaria spp.</i>	<i>Cladosporium spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
1	5,0 c	3,0 b	8,5 a	1,5 c
2	11,5 b	2,5 b	2,5 b	3,5 c
3	0,5 d	5,0 b	2,5 b	31,7 b
4	4,5 c	0,0 c	2,5 b	95,2 a
5	15,5 b	0,5 c	1,0 b	88,7 a
6	1,0 d	0,5 c	1,5 b	94,0 a
7	5,5 c	13,0 a	1,5 b	85,2 a
8	8,0 b	1,0 c	4,5 b	39,7 b
9	43,5 a	11,5 a	10,5 a	1,8 c
CV(%)	68,9	49,7	39,6	17,4
Correlação (r)				
PLG	0,14 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,51*	-0,79**
GE	0,23 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,59**	-0,89**
EAS	0,00 ^{ns}	-0,39*	0,29 ^{ns}	-0,67*
EPSO	-0,22 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,26 ^{ns}	-0,74**
EPSU	0,16 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,53*	-0,93**

Médias seguidas por mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%; CV= coeficiente de variação; PLG=primeira leitura da germinação; GE= teste de germinação; EAS= envelhecimento acelerado com solução salina de NaCl; EPSO= emergência de plântulas em solo; EPSU= emergência de plântulas em substrato. ns = não significativo; * = significativo a 5%;** = significativo a 1%.

Após a inoculação de *Pseudomonas spp.* o percentual de plântulas normais a partir de sementes dos lotes 4, 5, 6 e 7 foi nulo, com incidência da bactéria nas sementes duras superior a 40%. Entretanto, os lotes 1, 2, e 3 mantiveram elevado desempenho germinativo, mesmo após receber a inoculação da bactéria, apresentando percentuais médios de plântulas normais

iguais ou superiores a 90% (Tabela 3). Este resultado indica que a presença da bactéria não foi, isoladamente, a responsável pelo resultado dos lotes com menor desempenho germinativo, uma vez que, sua inoculação não diminuiu o percentual de germinação dos lotes de melhor vigor.

Ao que parece, a bactéria não foi a única responsável pelo baixo desempenho dos lotes 4, 5, 6 e 7 tanto nos testes de qualidade fisiológica (Tabela 1), quanto no teste de germinação após sua inoculação (Tabela 3), pois, os lotes 1, 2 e 3 classificados como os de maior vigor (Tabela 1) mantiveram elevados percentuais de germinação após a inoculação (Tabela 3). Além disso, as variações observadas na comparação entre os resultados dos testes de germinação antes e, após a inoculação com *Pseudomonas* spp. demonstraram que, houve aumento de 14% no percentual de plântulas normais germinadas no lote 3 e, a maior redução deste percentual foi de apenas 7,2% no lote 2 (Figura 1). Este resultado permite inferir que a proliferação bacteriana e seus possíveis danos, dependem do nível de deterioração pré-existente nas sementes e também, das condições de ambiente como temperatura e umidade. Segundo MARCOS FILHO (2015), as bactérias se multiplicam com intensidade sob condições de alta umidade, podendo contaminar as sementes através de ferimentos. O que nos leva a supor que, no presente estudo as bactérias tenham encontrado nos lotes de menor qualidade fisiológica, um meio favorável para sua reprodução, pois, conforme FRANK et al. (2017) a incidência de microrganismos é uma das evidências do processo de deterioração de sementes.

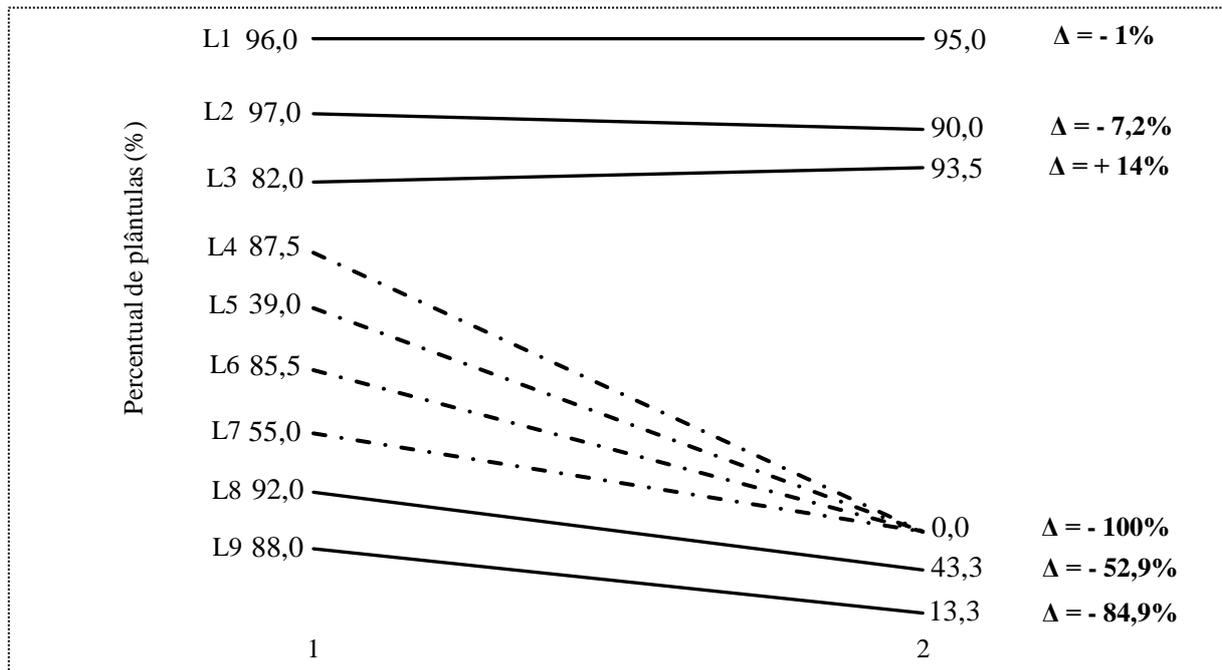
Tabela 3. Percentuais médios de plântulas normais na primeira leitura da germinação (PLG) e na germinação (GE) de nove lotes de sementes de alface após inoculação com bactérias do gênero *Pseudomonas*. UENP-CLM, Bandeirantes/PR, 2020.

Lotes	PLG	GE	PIPSD*
1	91,5 a	95,0 a	0,8 c
2	82,8 b	90,0 a	1,8 c
3	83,3 b	93,5 a	0,9 c
4	0,0 d	0,0 d	47,6 a
5	0,0 d	0,0 d	44,4 a
6	0,0 d	0,0 d	47,0 a
7	0,0 d	0,0 d	42,6 a

8	33,0 c	43,3 b	15,9 b
9	3,3 d	13,3 c	19,9 b
CV(%)	17,5	14,4	17,4

*PIPSD= percentual de incidência de *Pseudomonas* spp. em sementes duras no final do teste de germinação; Médias seguidas por mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%; CV= coeficiente de variação.

Figura 1. Variação entre os percentuais de plântulas normais observados nos testes de germinação de nove lotes de sementes de alface, sem e com inoculação de *Pseudomonas* spp. UENP-CLM, Bandeirantes/PR, 2020.



A atuação de fitopatógenos na deterioração das sementes, de acordo com BERJAK et al. (2014), depende da interação entre suas condições físicas e fisiológicas no início do armazenamento, bem como, dos fatores ambientais predominantes no decorrer desse período. Existe envolvimento simultâneo, no que diz respeito a menor qualidade fisiológica das sementes propiciar a proliferação de fungos, com o desenvolvimento de fungos provocar a deterioração de sementes. Segundo NELSON (2018), durante a embebição no início do processo de germinação, sementes em processo de deterioração tendem a diminuir a permeabilidade seletiva das membranas celulares e, com isso, exsudados são liberados através do tegumento rompido. As substâncias liberadas do interior das sementes servem como nutrientes para a flora microbiana a elas associadas, estimulando o seu rápido crescimento e colonização das sementes e, de seu entorno.

Em relação aos gêneros de microrganismos encontrados, embora não tenha sido realizada a identificação de espécie e, portanto, não seja possível afirmar sua fitopatogenicidade, vale lembrar que, estes agentes não deveriam estar associados a sementes comerciais. Segundo o manual de análise sanitária de sementes, as bactérias encontradas nas sementes estão na fase latente, em baixas populações tendo sua multiplicação paralisada. Muitas das bactérias fitopatogênicas permanecem viáveis pelo mesmo período de viabilidade das sementes. A semente infectada pode ou não apresentar sintomas, sendo que na maioria dos casos não apresenta (BRASIL, 2009b). Os resultados do presente estudo servem de alerta, para que os testes que verificam a qualidade sanitária sejam realizados em maior escala em sementes comerciais de alface, devido a sua reconhecida importância nacional e internacional.

4 CONCLUSÃO

Os lotes de sementes de alface apresentaram diferentes níveis de vigor e contaminação por microrganismos. Foram identificados os gêneros de fungos *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. e o gênero de bactéria *Pseudomonas* spp. que foi observada em maior proporção, em relação aos demais microrganismos.

A multiplicação e potencial de redução da germinação dos lotes, pelos microrganismos identificados, esteve intrinsecamente relacionada ao nível de deterioração pré-existente dos lotes, portanto, os microrganismos não provocaram danos ao potencial germinativo dos lotes de maior vigor.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e, à Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação.

REFERÊNCIAS

BERJAK, P.; CHERIAN, J.; MAKHATHINI, A. P.; SERSHEN, N.; PAMMENTER, N. W. Embryonic axes of a tropical recalcitrant-seeded species: successful elimination of microorganisms and potential for zygotic synthetic seed (synseed) production. **Seed Science and Technology**, v. 42, n. 2, p.150-160. 2014. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2014.42.2.04>.

BHAJBHUJE, M. N. Seasonal diversity of seed borne micro-fungal flora in storage on *Solanum melongena* L. **International Journal of Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 31-43, 2014.

BRASIL. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Brasília: MAPA/DAS. 200 p. 2009b.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Brasília: MAPA/ACS. 2009a. 399 p.

BRASIL. **Portaria nº 111, de 4 de setembro de 2012**. Diário Oficial da União, Brasília, 2012. Seção 1, p. 3-4.

BRUNO, G. B.; BRUNO, R. L. A.; ARAÚJO, E. Micoflora das sementes de oito espécies olerícolas cultivadas no Estado da Paraíba. **Agropecuária Técnica**, v. 11, p. 89-93. 1990.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (Eds). **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP. 2012. 590 p.

CECCHERINI, G. J.; LIMA, T. J. L.; MARCHI, L. F.; SALA, F. C. Avaliação de diferentes volumes de bandejas sobre o desenvolvimento de alface. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 30-36. 2018. DOI: <https://doi.org/10.4322/2359-6643.08104>.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre: Artmed. 608 p. 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**. v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019. DOI: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567-591, 2016. DOI: 10.1093/jxb/erv490.

FRANK, A. C.; GUZMÁN, J. P. S.; SHAY, J. E. Transmission of Bacterial Endophytes. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 2-21, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>.

JAJOR, E.; KOZLOWSKA, M.; WOJTOWICZ, M. Prevalence of fungi of the genus *Alternaria* on rape siliques and seeds depending on weather conditions. **Progress in Plant Protection**, v. 52, n. 4, p. 1011-1015, 2012. DOI: 10.14199/PPP-2012-174.

KIKUTI, A. L. P.; MARCOS FILHO, J. Testes de vigor em sementes de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 44-50. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000100008>.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2a ed. Londrina, BR: ABRATES. 2015. 660 p.

NASCIMENTO, W. M. **Hortaliças: Tecnologia de Produção de Sementes**. Brasília, BR: Embrapa Hortaliças. 2011. 316 p.

NELSON, E. B. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. **Plant and Soil**, v. 422, p. 7-34. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>.

PAIVA, C. T. C.; SILVA, J. B.; DAPONT, E. C.; ALVES, C. Z. CARVALHO, M. A. C. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes comerciais de alface e repolho. **Revista de Ciências Agroambientais**, v.14, n.1, p.53-59, 2016.

PARISI, J. J. D.; BIAGI, J. D.; MEDINA, P. F.; BARBEDO, C. J. Fungicide and drying effects on the viability of recalcitrante seeds of *Inga vera* subsp. *affinis*. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, p. 177-182. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0084-6>.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. *Alternaria* spp. In Oleraceous: Symptoms, Etiology, Management and Fungicides. **Biológico**, v. 77, n. 1, p. 21-34, 2015.