

PATOLOGIA DE SEMENTE

Laudelino Carneiro Leite*

Fernando Tavares Fernandes*

Ronaldo de Oliveira Feldmann**

SEMENTE

É constituída do embrião, endosperma e tegumento.

O embrião ou este mais o endosperma ocupam a maior parte do volume da semente enquanto o tegumento experimenta considerável redução a partir da sua origem.

A micrópila pode permanecer com o poro fechado ou ser obstruída. O funículo, todo ou em parte sofre abscisão deixando uma cicatriz, o hilo, considerado como a parte da semente mais permeável à água. Em óvulos anátropos, parte do funículo permanece reconhecível como uma linha saliente, rafe, em uma face da semente.

OBJETIVOS

O objetivo da patologia de semente é determinar o estado sanitário das sementes, por amostragem, e fornecer informações a respeito dos lotes, possibilitando uma comparação entre os diferentes lotes.

A patologia de semente é importante porque:

- a) Os patógenos transportados pelas sementes podem se constituir na fase inicial do desenvolvimento de uma doença no campo, causando perdas econômicas.
- b) Sementes importadas podem introduzir doenças em novas regiões portanto, na quarentena e no Serviço de certificação de semente internacional, faz-se necessário o conhecimento de patologia de semente.

* Pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - Fitopatologia.

** Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - Tecnologia de Semente.

- c) Na fase de desenvolvimento da plântula, a patologia de semente pode elucidar as causas da baixa germinação e problemas de desenvolvimento no campo; suplementando os testes de pureza e germinação da tecnologia de semente.

Alguns conceitos de Patologia de Semente:

- Sanidade de semente: Refere-se, principalmente, a presença ou ausência de organismos causadores de doenças, tais como: fungo, bactéria, vírus e nematóides, mas podem envolver os insetos e distúrbios fisiológicos como deficiência de nutrientes.
- Incubação: É a manutenção das sementes em condições favoráveis de desenvolvimento dos patógenos ou sintomas.
- Tratamento: Qualquer processo físico ou químico, que o lote de semente é submetido.
- Pré-tratamento: Vem a ser qualquer tratamento físico ou químico nas amostras de trabalho, antes da incubação, visando facilitar os testes.
- Amostra de trabalho: É uma quantidade representativa, do lote de semente, necessária para a realização do teste. O número de semente a ser amostrada, dependerá do método a ser utilizado, e do rigor a desejar. Comumente são utilizadas 400 sementes.

CLASSES DE SEMENTES

- a) Semente genética: a produzida sob a responsabilidade e o controle direto do melhorador de plantas e mantida dentro de suas características de pureza genética;
- b) Semente básica: a resultante da multiplicação da semente genética ou básica, realizada de forma a garantir sua identidade e pureza genética, sob a responsabilidade da entidade que a criou ou a introduziu;
- c) Semente registrada: a resultante da multiplicação da semente genética, básica ou registrada, produzida em campo específico, de acordo com as normas estabelecidas pela entidade certificadora;
- d) Semente certificada: a resultante da multiplicação de semente básica, registrada ou certificada, produzida em campo específico, de acordo com as normas estabelecidas pela entidade certificadora.

IDENTIFICAÇÃO E REGISTRO DOS PATÓGENOS

De acordo com as regras do ISTA pelo menos 400 sementes devem

ser examinadas nos testes "Standart" tanto "agar test" como "blotter test". Patógenos e alguns saprófitos de cada semente tem que ser identificados e registrados dentro de um espaço de tempo razoavelmente curto. Para um satisfatório treinamento, necessário torna-se o conhecimento dos relevantes caracteres diferenciais entre estes organismos. Para alcançar esta perícia, treinamento e experiência prática devem ser suportadas por pesquisas quanto as características para diagnose, e suas variações, sob diferentes condições de rotina.

O princípio para anotações em "agar test" é o exame macroscópico das colônias dos patógenos. Um analista experiente, familiarizado com as características do fungo presente em certa espécie de semente, pode identificar e anotar as colônias a olho nu, examinando os dois lados das placas (inferior e superior). Porém às vezes surgem problemas neste teste, porque as colônias emergem de sementes que usualmente possuem um complexo de fungos que podem mascarar e inibir outros.

O "blotter test" é uma combinação de "in vitro" e "in vivo". O registro é feito com auxílio de um microscópio estereoscópio dotado de zoom, observando-se os fungos "in situ" na sua hospedeira sob condição de crescimento. Este é o grande mérito do "blotter test".

A essencial base de registro no blotter test, é a identificação rápida dos hábitos característicos a cada espécie e as características exibidas tais como: forma, comprimento, arranjo dos conídios no conidióforo, septação; cor, formação de cadeias, tamanho dos conídios, etc.; aparência da massa de esporos, características do micélio, densidade, cor, etc.

PRINCIPAIS TESTES UTILIZADOS

a) Blotter test

O Blotter test descrito inicialmente por J. DE TEMPE (1963) utilizou como recipiente para incubação bandeja de zinco e recomendava também, a utilização bandejas de alumínio ou plástico de 10 x 25 cm; sem tampa, nas quais colocava-se o papel de filtro umedecido, sobre a qual eram depositadas as sementes, separadas entre si de pelo menos 2 cm e em seguida colocadas em um incubador com temperatura controlada e alto teor de umidade. Após o período de incubação as sementes e plântulas eram examinadas quanto a sintomas ou presença de microorganismos, com o auxílio de microscópio estereoscópico ou microscópio.

O Blotter test é um dos métodos mais utilizado em laboratório de Patologia de semente, por fornecer dados da viabilidade da semente e da patogenicidade de grande número de fungos. O método apresenta uma série de adaptações de acordo com as condições locais.

Adaptações de Blotter test:

- a.1. Blotter test: Os papéis de filtro são umedecidos e colocados nos recipientes fechados (normalmente, placas de Petri

de plástico de 9,5 cm de diâmetro), mantendo assim alta umidade; a distância entre as sementes no mínimo de 2 cm, período de incubação de 4 - 20 dias, de acordo com o patógeno, temperatura e espécie em estudo e temperatura de 10 a 30 °C. Normalmente, se utiliza a lâmpada fluorescente a 40 cm da semente, com um regime de luz alternada de 12 horas, mas visando um estímulo na esporulação e de alguns fungos, pode-se substituir a luz fluorescente pela luz negra, LEACH 1971. A identificação no final é feita visualmente ou com o auxílio de microscópio estereoscópico ou pela observação de esporos em microscópio. Pode ser utilizado para a observação da maioria dos fungos patogênicos de soja, milho, feijão, trigo, arroz, etc...

- a.2. 2-4-D-Blotter method: A metodologia é a mesma do teste anterior (a.1), apenas substituímos a água utilizada para o umedecimento do papel de filtro, por uma solução 0,2% de sal de sódio de ácido 2,4-diclorofenoxocético (2-4-D), visando a inibição da germinação da semente, com um risco menor de mascaramento dos resultados pela contaminação de uma semente sadia pela semente doente do lado. Este teste é utilizado para identificação de: *Alternaria brassicae*; *Phoma lingam*; *Rhizoctonia solani*; *Whetzelina sclerotiorum*; patógenos do milho, etc.
- a.3. Deep-freezing Blotter method: A metodologia é a mesma do Blotter test (a.1), apenas exige um pré-tratamento antes da incubação propriamente dita, a temperatura desejada. Este método, basicamente, possui o mesmo princípio de funcionamento de 2-4-D-Blotter method onde difere apenas no processo utilizado na inibição, neste o processo é físico e no outro químico. De acordo com a espécie e o patógeno em estudo escolheremos o método. O Deep-freezing Blotter method é bastante utilizado para identificação dos patógenos das crucíferas.
- a.4. Papel de filtro Blotter method: Este método consiste em utilizar um papel de filtro de 44 x 34 cm, anteriormente umedecido com água, sobre a qual deposita-se 50 sementes, com ou sem pré-tratamento, o qual é enrolado e incubado a 20°C a uma umidade de 95-100% no escuro. As observações são realizadas 7 dias após, a olho nu ou com o auxílio de microscópio estereoscópico e microscópio. É bastante utilizado para a detecção da antracnose do feijoeiro, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

b) Método com Agar

De acordo com T. LIMONARD (1968) quando se utiliza método com agar as sementes são colocadas em Nutrientes Agar (comumente batata dextrose agar BDA ou extrato Malte agar. MA), em placas de Petri.

Normalmente faz-se o pré-tratamento da semente com hipoclorito de sódio 0,5% ou 1% durante 10 ou 5 minutos respectivamente, para eliminar os saprófitas aderidos a semente, e então, incuba-se a semente em diferentes condições de acordo com os objetivos do teste. Procura-se utilizar as placas de plástico, quando se utiliza a luz negra, por serem transparentes a esta luz.

O objetivo do teste é induzir o desenvolvimento dos patógenos, facilitando assim a sua identificação que poderá ser feita a olho nu através das características da colônia ou com o auxílio de microscópio este - roscópio e microscópio.

Neste método o desenvolvimento do fungo é rápido, portanto, não teremos idéia da sua patogenicidade nem da porcentagem de germinação das sementes.

É bastante utilizado para detecção de diferentes gêneros de fungo, como o *Fusarium*, *Drechslera*, *Rhizoctonia*, *Diplodia*, etc.

BIBLIOGRAFIA

- ANSELME, CL.; JAILLOUX, F. & CHAMPION, R. "Methodes d'analyse sanitaire des semences de lin". Proc. Int. Seed Test. Ass. 31(2):157-167, 1966.
- AULAKH, K.S.; MATHUR, S.B. & NEERGAARD, P. Seed health testing of rice and comparison of field incidence with laboratory counts of *Drechslera oryzae* and *Pyricularia oryzae*. Seed Science and Technology, 2(3):393-398, 1974.
- CHVAIPRASIT, G.; MATHUR, S.B. & NEERGAARD, P. The light factor in Seed health testing. Seed Science and Technology, 2(4): 457-475, 1974.
- CHAMPION, R. Quelques parasites cryptogamiques importants transmis par les semences. Revue Agriculture, 322, Juin 1969.
- COPELAND, L.O.; ADAMS, M.W. & BELL, D.C. An improved seed programme for maintaining disease-free seed of field beans (*Phaseolus vulgaris*). Seed Science and Technology, 3(3/4): 719-724, 1975.
- FAKIR, GOLAM A.; RAO, M.H. & THIRUMALACHAR, M.J. Seed transmission of *Macrophomina phaseolina* in Sunflower. Plant Disease Reporter, 60:735-737, 1976.
- KHARE, L. & WIKLERT, P. Sand as substrate for germination. Proc. Int. Seed Test. Ass., 30(2):245-250, 1965.
- KHARE, M.N.; MATHUR, S.B. & NEERGAARD, Paul. A Seedling Syntom Test for Detection of *Septoria nodorum* in Wheat Seed. Seed Sci. & Technol., 5:
- KOOPMAN, M.J. F. & TEMPE, J. Comparison of laboratory evaluation and field performance of flax seed. Proc. Int. Seed Test Ass., 19(1): 24-31, 1954.
- KULIK, M.M. Detection of seed-borne microorganisms: other test. Seed Science and Technology, 1(1):255-280, 1973.
- KULSHRESTHA, O D.; MATHUR, S.B. & NEERGARRD, P. Identification of Seed-borne species of *Colletotrichum*. Friesia, 11:116-125, 1976.
- LEACH, CHARLES M. A Pratical guide to the effects of visible and ultra violet light on fungi. Methods in Microbiology, 4:609-664, 1971.
- LIMONARD, T. Ecological aspects of seed health testing. Proc. Int. Seed Test. Ass., 33(3):343-513, 1968.
- LIMONARD, T. Some remarks on the preparation of agar tests in seed health investigation. Proc. Int. Seed Test. Ass., 32(3):603-614, 1967.

- LUNGSGAARD, T. Routine Seed Health testing for Barley Stripe Mosaic virus in Barley Seeds using the Ratex-Test. Reprinted from Zeitschr Pflkrankh Pflsehuts, 83:278-283, 1976.
- MALONE, J P. & MUSKETT, A.E. Seed-borne fungi: description of 77 fungus species. Proc. Int. Seed Test. Ass., 29(2):179-384, 1964.
- MAROV, J. & MESSIAEN, C.M. The *Chenopodium quinoa* test: a critical method for detecting seed transmission of lettuce mosaic virus. Proc. Int. Seed Test. Ass., 32(1):49-57, 1967.
- NATH, R.; NEERGAARD, P. & MATHUR, S.B. Identification of *Fusarium* species on seeds as they occur in Blotter test. Proc. Int. Test. Seed Ass., 35(1):121-144, 1970.
- NEERGAARD, P. Detection of seed-borne pathogens by culture tests. Seed Science and Technology, 1(1):217-254, 1973.
- NEERGAARD, P. Historical development and current practices in seed health testing. Proc. Int. Seed Test. Ass., 30(1):99-118, 1965.
- NEERGAARD, P. Seed-borne diseases (Inspection for quarantine in Africa). Hand book for Phytosanitary Inspections in Africa, 380-393, 1965.
- NOBLE, M. Introduction to series 3 of the handbook on seed health testing. Proc. Int. Seed Test. Ass., 30(4):1045-1047. 1965.
- PHATAK, H.C. Seed-borne plant viruses: identification and diagnosis in seed health testing. Seed Science and Technology, 2(1):3-155, 1974.
- ROBERTS, R.M. The effect of storage conditions on the viability of grass seed. Proc. Int. Seed Test. Ass., 24(1): 184-213, 1959.
- SAETTLER, A.W. Seedling infection as an aid in identifying bean blight bacteria. Plant. Disease Reporter, 55(8): 703-706, Aug. 1971.
- SCHUSTER, M.L. Survival of bean bacterial pathogens in the field and green house under different environmental conditions. Phytopathology, 57(8): 830, Aug. 1967. (Abstract).
- SINGH, D. & MATHUR, S B. *Sclerotium rolfsii* in seeds of bean from Uganda. Seed Science and Technology, 2(4):481-483, 1974.
- SINGH, D.V.; MATHUR, S.B. & NEERGAARD, P. Seed health testing of maize: evaluation of testing techniques, with special reference to *Drechslera maydis*. Seed Science and Technology, 2(3):349-365, 1974.
- SRINIVASAN, M.C., CHIDAMBARAM, P., MATHUR, S.B. & NEERGAARD, P. A simple method for Inducing sporulations in seed-borne fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 56:31-35, 1971.

- SRINIVASAN, M.C.; NEERGAARD, P. & MATHUR, S.B. A technique for detection of *Xanthomonas campestris* in routine seed health testing of crucifers. Seed Science and Technology, 1(4):853-859, 1973.
- TEMPE, J. Comparison of methods for seed health testing. Proc. Int. Seed Test. Ass., 27(3):819-828, 1962.
- TEMPE, J. Health testing of flax seed. Proc. Int. Seed Test. Ass., 28(1):107-131, 1963.
- TEMPE, J. *Helminthosporium* spp. in seeds of wheat barley oats and rye. Proc. Int. Seed Test. Ass., 29(1):117-140, 1964.
- TEMPE, J. Inspection of seeds for adhering pathogenic elements. Proc. Int. Seed Test. Ass., 28(1):153-165, 1963.
- TEMPE, J. Introduction to subjecting: sanitary condition and seed disinfection. Proc. Int. Seed Test. Ass., 30(4):1031-1038, 1965.
- TEMPE, J. On methods of seed health testing principles and practice. Proc. Int. Seed Test. Ass., 28(1):97-105, 1963.
- TEMPE, J. Recent development in seed health testing. Proc. Int. Seed Test. Ass. 29(3):479-486, 1964.
- TEMPE, J. Routine investigation of seeds for their health condition in the Dutch Seed Testing Station at Wageningen. Proc. Int. Seed Test. Ass., 22(1):354-370, 1957.
- TEMPE, J. Routine methods for determining the health condition of seeds in the seed testing station. Proc. Int. Seed Test. Ass., 26(1):27-60, 1961.
- TEMPE, J. Seed-borne *Fusarium* infection in temperate climate cereals. Proc. Int. Seed Test. Ass., 29(1):97-116, 1964.
- TEMPE, J. The Blotter method for seed health testing. Proc. Int. Seed Test. Ass., 26(1):133-151, 1963.
- TEMPE, J. Three years of field experiments on seed-borne disease and seed treatment of cereals. Proc. Int. Seed Test. Ass., 23(1):38-67, 1958.
- YAMASHITA, J., MENEZES, J.R., ROSSETO, E.A. Patologia de sementes. Apostila. 1978. Londrina. Pr.
- WALKER, J.C. & PATEL, P.N. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo blight of beau. Phytopathology, 54(2):140-141, Feb. 1964.