

GIANNA MARIA CIRIO

**DETECÇÃO E CONTROLE DE FUNGOS EM
SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.) ARMAZENADAS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências. Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^ª Maria Lúcia R. Z. da Costa Lima

CURITIBA
JULHO — 1998



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **GIANNA MARIA CIRIO**, sob o título "**DETECÇÃO E CONTROLE DE FUNGOS EM SEMENTES DE MILHO (ZEA MAYS L.) ARMAZENADAS**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação com conceito: (**B**).

Curitiba, 1º de junho de 1998.

Professor Dr. Flávio Antonio Lazzari
Primeiro Examinador

Dr. Celso Auer
Segundo Examinador

Professor Dr. Edilberto Possamai
Terceiro Examinador

Professor Dr. Luiz Doni Filho
Quarto Examinador

Professora Dra. Maria Lúcia R. Z. da Costa Lima
Presidente da Banca e Orientadora

Aos meus pais, Quinto e Raquel

que investiram na educação dos filhos.

Aos meus afilhados Michelle e Roney.

In memoriam, Amalia Bassa, Joseney e Jalyne.

OFEREÇO e DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Curso de Pós-Graduação pela oportunidade.

Agradeço o apoio de professores e funcionários da Universidade, àqueles que serviram como exemplo de trabalho e dedicação e que muito nos incentivaram.

Agradeço aos amigos Célia Regina Nascimento, Celso Zenon Janoski e Andrea Aparecida W. Krefta.

À todos os técnicos da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento pelo apoio e pela amizade e à Dra Neuza Rucker e M. Sc. Disoney Zampieri.

Em especial ao Dr Flávio Antonio Lazzari e Professora Dra Maria Elizabete Doni.

Agradeço a professora orientadora Dra Maria Lúcia R. Z. Costa Lima e aos meus co-orientadores Dr Luiz Doni Filho e M. Sc. Henrique Soares Koehler.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE FUNGOS	7
2.1.1 Teste do Blotter.....	8
2.1.2 Meios de Cultura.....	8
2.1.3 Teste de Germinação das Sementes.....	11
2.1.4 Teor de Umidade das Sementes.....	12
2.2 TRATAMENTO DE SEMENTES DE MILHO COM FUNGICIDAS.	12
2.3 ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE FUNGOS.....	17
3.1.1 Testes Preliminares - Preparo do Material.....	17
3.1.2 Teste do Blotter.....	17
3.1.3 Meio de Cultura Ácido de Batata Dextrose Ágar (BDA).....	18

3.1.4	Teste de Germinação.....	19
3.1.5	Determinação da Umidade das Sementes.....	19
3.2	TRATAMENTO DE SEMENTES COM FUNGICIDAS	20
3.3	ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES DE MILHO.....	21
3.4	DETECÇÃO DE FUNGOS NAS SEMENTES ARMAZENADAS.	21
3.4.1	Teste do Blotter.....	21
3.4.2	Meios de Cultura.....	22
3.4.3	Teste de Germinação e Determinação do Teor de Umidade das Sementes	23
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	RESULTADOS DOS TESTES PRELIMINARES.....	27
4.2	DETECÇÃO DO GÊNERO <i>Penicillium</i> E EFEITOS DO TRATAMENTO FUNGICIDA.....	28
4.2.1	Avaliação aos 90 DAA (Dias Após Armazenamento).....	29
4.2.2	Avaliação aos 150 DAA (Dias Após Armazenamento).....	31
4.2.3	Avaliação aos 210 DAA (Dias Após Armazenamento).....	32
4.2.4	Avaliação aos 270 DAA (Dias Após Armazenamento).....	35
4.3	DETECÇÃO DO GÊNERO <i>Aspergillus</i> E EFEITOS DO TRATAMENTO FUNGICIDA.....	39
4.3.1	Avaliação aos 90 DAA (Dias Após Armazenamento).....	39
4.3.2	Avaliação aos 150 DAA (Dias Após Armazenamento).....	40
4.3.3	Avaliação aos 210 DAA (Dias Após Armazenamento).....	41

4.3.4	Avaliação aos 270 DAA (Dias Após Armazenamento).....	43
4.4	DETECÇÃO DO GÊNERO <i>Fusarium</i> E EFEITOS DO TRATAMENTO FUNGICIDA.....	48
4.4.1	Avaliação aos 90 DAA (Dias Após Armazenamento).....	48
4.4.2	Avaliação aos 270 DAA (Dias Após Armazenamento).....	50
4.5	GERMINAÇÃO DE SEMENTES.....	53
4.6	TEOR DE UMIDADE DE SEMENTES.....	57
5	CONCLUSÕES.....	59
6	RECOMENDAÇÃO.....	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8	ANEXOS.....	66

LISTA DE FIGURAS

- 1 - TESTE DO BLOTTER, DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE MILHO EM GERBOX COM SUBSTRATO DE PAPEL FILTRO, EM CARREIRAS EQUÍDISTANTES. UFPR. CURITIBA. PR. 1996..... 22
- 2 - DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE MILHO EM PLACAS DE PETRI COM MEIO DE BATATA DEXTROSE ÁGAR (BDA). UFPR. CURITIBA. PR. 1996..... 24
- 3 - DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE MILHO EM PLACAS DE PETRI EM MEIO DE ÁGAR SUCO DE TOMATE (AST). UFPR. CURITIBA. PR. 1996..... 24
- 4 - EFEITO DOS MEIOS DE CULTURA BDA E AST NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE MILHO. UFPR. CURITIBA. PR. 1996..... 56

LISTA DE TABELAS

- 1 - DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS E DOS MÉTODOS DE INCUBAÇÃO UTILIZADOS NAS SEMENTES DE MILHO. UFPR. CURITIBA. PR. JUNHO/ 1995..... 25
- 2 - INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM SEMENTES DE MILHO INTEIRAS E MEIAS SEMENTES AVALIADAS PELO MEIO DE CULTURA DE BDA E PELO BLOTTER. 1º DAA. UFPR. CURITIBA. PR. JULHO/ 1995..... 27
- 3 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *PENICILLIUM* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT 90 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. OUTUBRO/ 1995..... 29
- 4 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *PENICILLIUM* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. 150 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. DEZEMBRO/ 1995..... 31
- 5 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *PENICILLIUM* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. 210 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. FEVEREIRO/ 1996..... 33
- 6 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *PENICILLIUM* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. 270 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. ABRIL/ 1996..... 35
- 7 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *ASPERGILLUS* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. 90 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. OUTUBRO/ 1995..... 40
- 8 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *ASPERGILLUS* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT.150 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. DEZEMBRO/ 1995..... 41
- 9 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *ASPERGILLUS* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS DE BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT,STI E STT. 210 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. FEVEREIRO/ 1996..... 42

- 10 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *ASPERGILLUS* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. 270 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. ABRIL/ 1996..... 44
- 11 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *FUSARIUM* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. 90 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. OUTUBRO/ 1995..... 49
- 12 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *FUSARIUM* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS BDA, AST E BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. 270 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. ABRIL/ 1996..... 50

LISTA DE GRÁFICOS

- 1 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *Penicillium* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS DE CULTURA DE BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. NO 1º DIA E AOS 90, 150, 210 E 270 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. JUNHO/1995 A ABRIL/ 1996..... 38
- 2 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *Aspergillus* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS DE BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. NO 1º DIA E AOS 90, 150, 210 E 270 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. JUNHO/1995 A ABRIL/ 1996..... 47
- 3 - INCIDÊNCIA DO GÊNERO *Fusarium* EM SEMENTES DE MILHO NOS MEIOS DE CULTURA BDA E AST E PELO BLOTTER NOS LOTES SNT, STI E STT. NO 1º DIA E AOS 90 E 270 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. JUNHO/ 1995 A ABRIL/ 1996..... 52
- 4 - PERCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO DOS LOTES SNT, STI E STT. NO 1º DIA E AOS 90, 150, 210 E 270 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. JULHO/95 A ABRIL/96..... 55
- 5 - TEOR DE UMIDADE NAS SEMENTES DE MILHO DOS LOTES SNT, STI E STT. NO 1º DIA E AOS 90, 150, 210 E 270 DAA. UFPR. CURITIBA. PR. JULHO/ 95 A ABRIL/ 96..... 58

RESUMO

Fungos aparecem em sementes de milho e podem afetar a qualidade das mesmas durante armazenamento. Os métodos de detecção de fungos em sementes, com composições específicas, selecionam patógenos e fornecem diferentes resultados, sendo que a utilização de fungicidas afetam esta população e se alteram durante tempo de armazenagem. Com o objetivo de verificar a eficácia e facilidade de execução dos testes para a determinação da incidência de fungos em sementes de milho armazenadas, foi desenvolvido o presente trabalho no laboratório de fitopatologia da Universidade Federal do Paraná (UFPr) em Curitiba. Na pesquisa foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com três repetições em arranjo fatorial de três métodos de detecção - nos meios de cultura de batata dextrose ágar ácido (BDA), ágar suco de tomate mais 6 % de cloreto de sódio (AST) e teste do papel-filtro (Blotter) - e três lotes de sementes - sementes tratadas com os fungicidas Iprodione (STI) e Thiabendazol (STT) e sementes não tratadas (SNT). As unidades experimentais foram gerbox de plástico (Blotter) e placas de petri de vidro (meios de cultura de BDA ácido e AST salino). As sementes foram avaliadas em estereo-microscópio após 7 dias de incubação quanto a percentagem de fungos incidentes e gêneros presentes e também a percentagem de germinação e teor de umidade das sementes foram determinados. Os testes foram ao primeiro dia e aos 90, 150, 210 e 270 dias após armazenagem (DAA). As sementes receberam o tratamento fungicida após os testes preliminares. Os gêneros incidentes nas sementes durante o período de armazenamento foram detectados por diferentes métodos: *Penicillium* em Blotter, *Aspergillus* em AST salino e *Fusarium* em BDA ácido. Os resultados foram incidência dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* nos testes preliminares, população crescente de *Aspergillus* aos 90, 150 e aos 210 DAA e redução de *Fusarium*, aos 270 DAA em relação ao início da armazenagem. Nas sementes com Thiabendazol foi verificado uma alta incidência de fungos, assim como redução da germinação. As sementes tratadas com Iprodione apresentaram as menores incidências de fungos e a maior germinação aos 270 DAA. Durante armazenamento, os gêneros de fungos incidentes nas sementes e os teores de umidade sofreram alterações com redução na percentagem de germinação.

ABSTRACT

Fungi may appear in maize seeds and they may affect their quality during storage. The fungi detection methods in seeds, with specific compositions, select pathogens and give different results and the fungicides used affect this population and change during storage time. With the purpose of verifying the efficacy and facility of test execution for the determination of the incidence of fungi in maize seeds stored, the present research was developed in the phytopathology laboratory at Paraná Federal University (PrFU) in Curitiba. In the research it was used a completely randomized design with three repetitions in factorial arrangement of three detection methods - acid potato dextrose agar (PDA), tomato juice agar (TJA) plus 6 % of salt (NaCl) and test of paper-filter (Blotter) - and three seed groups - seeds treated with the fungicides Iprodione (STI) and Thiabendazol (STT) and seeds not treated (SNT). The experimental units consisted of plastic boxes (Blotter) and petri glass dishes (acid PDA and salty TJA culture media). The seeds were evaluated with a stereo-microscope after seven days of incubation as to the percentage of fungi incident and the genera present, as well the percentage of germination and moisture content in seeds was determined. The tests were made at the first day and at 90, 150, 210 and 270 days after storage (DAS). The seeds received fungicide treatment after the preliminary tests. The genera incident in seeds during the storage period were detected by different methods: *Penicillium* in Blotter, *Aspergillus* in salty TJA and *Fusarium* in acid PDA. The results were: incidence of genera *Penicillium* and *Fusarium* in preliminary tests, growing population of *Aspergillus* at 90, 150, 210 DAS and a *Fusarium* reduction at 270 DAS, in relation to the beginning of storage time. In seeds treated with Thiabendazol was verify a high fungi incidence as well a reduction of germination. The seeds treated with Iprodione presented the lowest fungi incidence and the highest germination at 270 DAS. During storage, the fungi genera incident in maize seeds and the moisture content underwent alterations with reduction of germination percentage.

1 INTRODUÇÃO

As sementes são insumos básicos na produção agrícola moderna e cerca de 90 % dos alimentos são produzidos pelas mesmas. As sementes podem ser o alvo preferido de alguns fungos devido aos substratos apropriados ao desenvolvimento de algumas espécies (CARVALHO e NAKAGAWA, 1983; WETZEL, 1987; BERJAK, 1987 b; MENTEN, 1995).

A incidência de patógenos em sementes agrícolas, conduz a danos com redução da produtividade e dissemina doenças. A interferência de fungos nos processos fisiológicos essenciais da semente, podem favorecer o processo de deterioração durante o armazenamento, conduzindo à perda da capacidade germinativa até a morte das sementes (MENTEN, 1995).

Os fungos que invadem as sementes, são divididos em dois grupos ecológicos, conhecidos como fungos de campo e fungos de armazém. Os primeiros invadem as sementes no período de sua formação, desenvolvimento e maturação enquanto que os segundos têm a capacidade de se reproduzirem nos tecidos secos das sementes e de produção de toxinas, que afetam a viabilidade das sementes podendo estar no ar como contaminantes (KENNEDY, 1979; BERJAK, 1987 a, b; WETZEL, 1987).

Entre os principais fungos de armazenamento estão os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e a preocupação concedida a estes é devido à ocorrência de espécies com capacidade de produção de micotoxinas e sua onipresença na natureza (KENNEDY, 1979; WETZEL, 1987; GRIFFIN, 1994; PINTO, 1997).

Os fungos podem ser identificados nas sementes por diversos métodos, a dificuldade contudo, reside na precisão e na exatidão quando a população é pequena, mas que em determinadas condições pode vir a contaminar todo um campo ou um lote de grãos ou de sementes armazenadas.

Com o objetivo de monitorar a qualidade das sementes, diversos testes devem ser conduzidos no início, durante e ao final do armazenamento visando acompanhar a incidência de fungos; diferentes métodos que permitam o crescimento dos fungos nas sementes podem ser utilizados.

Ocorrem fungos em sementes recém-colhidas, assim o monitoramento torna-se importante, porém as metodologias disponíveis podem detectar melhor alguns fungos em detrimento de outros.

O objetivo geral deste trabalho foi o de verificar a eficiência e facilidade de execução dos testes para a determinação da incidência de fungos em sementes de milho armazenadas.

Os objetivos específicos foram verificar quais os métodos mais eficientes para detectar os fungos; determinar a eficiência deste método ao longo do tempo e avaliar o período eficiência mesmo em sementes tratadas com fungicidas, acompanhando a germinação durante armazenamento e o

teor de umidade das sementes, para os diferentes tratamentos.

A detecção de fungos de armazenamento é feita por diferentes métodos, então poderá haver um método que expresse melhor a sua presença devido a especificidade dos fungos quanto a componentes do meio e ambiente (umidade), além disso ocorre sucessão de fungos durante armazenagem pois os que incidem no início alteram o meio ambiente da semente favorecendo outros, de forma que diferentes metodologias devem ser empregadas. Para proteger a qualidade das sementes pode-se considerar o uso de fungicidas para proteger a germinação pois esta é afetada pela proliferação de fungos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitos fungos são produtores de micotoxinas, entre estes, espécies dos gêneros: *Aspergillus*, que produzem aflatoxina (carcinigênica) e ocratoxina, *Penicillium* produtor de griseofulvina e *Fusarium* de diacetoxiscirpenol e zearalenona, esta um composto estrogênico que afeta suínos. A dieta de animais composta de grãos de milho com teor de micotoxinas causam danos irreversíveis à saúde destes e também podem comprometer a integridade de quem consome carne, leite e outros produtos derivados (HASAN, 1993, PINTO, 1997).

Pertencendo ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, classe *Deuteromycetes*, estão os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. São com frequência detectados em sementes, com reprodução assexuada e em condições desfavoráveis de crescimento podem exibir sua forma teleomorfa ou sexuada, sendo então colocados na classe dos *Ascomycetes* (KRUGNER e BACCHI, 1995).

Os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* estão entre os fungos de armazenamento de maior frequência no Brasil e também estão associados à perda de viabilidade, à podridão e morte de sementes

(LUCCA FILHO, 1987; LUZ, 1995).

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* normalmente não invadem as sementes antes da colheita e podem ser encontrados nos testes em sementes recém-colhidas em baixas percentagens, em torno de 1 % (KENNEDY, 1979; WETZEL, 1987).

O gênero *Fusarium* é comum em milho, podendo invadir a semente de milho antes da colheita, e em condições de secagem mal conduzida pode vir a desenvolver-se durante o armazenamento; esta ocorrência pode indicar que os limites entre os fungos de campo e os de armazém não são tão bem definidos e por isso são denominados por BERJAK (1987 a) e LAZZARI (1993) como grupo intermediário.

A população fúngica em sementes armazenadas pode permanecer macroscopicamente indetectável por longo tempo, durante o qual ocorre crescimento do fungo às expensas dos tecidos da semente com acúmulo de metabólitos. A invasão fúngica ocorre tanto em sementes intactas como nas quebradas e com a germinação do esporo na superfície da semente a hifa penetra principalmente pela micrópila, que é a única descontinuidade natural do pericarpo, assim como ocorre no mecanismo de absorção da água, instalando-se internamente na semente (WETZEL, 1987; BERJAK, 1987 a; McDONALD et al., 1994).

Os fungos de armazenamento podem estabelecer seu micélio nos tecidos mais secos das sementes e com acesso à umidade atmosférica se desenvolvem consumindo substratos, elevando o teor de umidade e temperatura da semente e alterando o micro-ambiente interno da semente, favorecendo a proliferação de espécies de fungos e levando à

degenerescência total da semente com o tempo (WETZEL, 1987; MYCOCK e BERJAK, 1992; INGOLD, 1992).

Muitas das espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* podem aparecer como saprófitas no solo e em matéria vegetal em decomposição e as fitopatogênicas têm sido detectadas com maior frequência em frutos e sementes. Algumas espécies destes fungos podem ser xerofílicas e tolerantes ao frio e são facilmente disseminadas devido aos seus esporos pequenos e secos (BERJAK, 1987 a; DEACON, 1984; GRIFFIN, 1994; KRUGNER e BACCHI, 1995; LUZ, 1995, 1996 b).

LUZ (1995) encontrou no Brasil espécies de *Penicillium* em praticamente todas as regiões produtoras de milho, mas a incidência é geralmente baixa, ocorrendo com maior frequência em sementes armazenadas com alta umidade e em regiões de clima temperado.

As espécies do gênero *Aspergillus* tendem a predominar em áreas tropicais e são iniciadores da deterioração em sementes, podendo ser xerofílicas ou xerotolerantes, crescendo em baixo potencial de água. Estudos demonstram que espécies de *Aspergillus* podem infectar o milho antes da colheita, particularmente durante o estágio de aparecimento de cabelo na espiga, quando os grãos estão em estado leitoso, podendo ocorrer a invasão pelo fungo e a produção de toxinas, especialmente em temperaturas elevadas e baixa pluviosidade (DEACON, 1984; COSTA e KUSHALAPPA, 1989; LUZ, 1995).

No Brasil, espécies do gênero *Aspergillus*, são encontrados causando danos no embrião, descoloração, alterações nutricionais, perda de matéria

seca (MILLS, 1983; GRIFFIN, 1994; LUZ, 1995).

As espécies do gênero *Fusarium*, que ocorrem no milho no Brasil, infectam grãos, especialmente em locais de temperaturas mais amenas e úmidas onde podem produzir micotoxinas. Estes fungos são favorecidos pela ocorrência de chuvas durante maturação e no período de colheita, assim persistindo por longos períodos em sementes de milho armazenadas com teores de umidade de 11 e 12 % (WETZEL, 1987; BERJAK, 1987 a; LUZ, 1995).

2.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE FUNGOS

A *International Seed Testing Association* (ISTA) desde 1966 vem avaliando metodologias para a detecção de microrganismos associados às sementes e preconiza, entre outros, o uso do método de papel de filtro ou teste do Blotter e de meios de cultura para isolamento de patógenos-alvo.

2.1.1 Teste do Blotter

O teste do Blotter expressa a população fúngica da semente em presença apenas de umidade, o que foi considerado vantajoso por ONO et al. (1996); estes autores detectaram grande número de gêneros fúngicos em amostras de milho da região sul do Paraná, inclusive gêneros que ocorrem

em baixa incidência.

NEERGAARD (1979), recomenda o teste do Blotter onde combinam-se princípios *in vivo* e *in vitro*, permitindo a observação de fungos se desenvolvendo em condições naturais e podendo ser empregado para todas as sementes. Tem sido utilizado com mais frequência por permitir um número maior de repetições e não envolver trabalho de laboratório especializado como em relação ao preparo de meios de cultura. É um teste relativamente simples, não requerendo materiais e equipamentos sofisticados e fornecendo uma visão ampla das condições fitossanitárias das sementes.

2.1.2 Meios de Cultura

Quando o objetivo é a detecção de determinadas espécies, utiliza-se os meios seletivos que oferecem determinados nutrientes necessários ao crescimento do patógeno-alvo em detrimento ao de outras espécies. Além disso, é importante que o meio seletivo iniba completa ou parcialmente organismos indesejados, ou seja, fungos de crescimento rápido como *Rhizopus*, que podem mascarar a detecção de fungos-alvo (GRIFFIN, 1984; INGOLD, 1992).

O meio de cultura para crescimento de determinados fungos em condições de laboratório deve ter, além da água, substâncias orgânicas que são fonte de carbono e de nitrogênio, íons inorgânicos e quantidade apreciável de outros íons orgânicos e fatores de crescimento além de

umidade, luz e oxigênio (INGOLD, 1992).

Quando se visa a detecção de fungos de armazenamento, os mesmos podem ser mascarados ou até impedidos de crescer por gêneros que têm capacidade de crescimento nos meios de culturas utilizados ou mesmo sobre a própria semente, para NEERGAARD (1979) e LASCA (1997) o uso de métodos diferentes deve fornecer resultados diferentes.

O *Seed Storage Committee*, instituído pela ISTA, estuda os problemas que afetam o armazenamento de sementes. Este grupo sugere a utilização de meios de cultura de batata-dextrose-agar (BDA) ou outros como Czapeck-Dox, Malte Sal Agar, desde que acrescidos de cloreto de sódio a concentrações de 6 a 30 % ou sacarose à concentrações de 4 a 50 % para o isolamento de fungos de armazenamento como *Penicillium* e *Aspergillus* (BERJAK, 1987 b; WETZEL, 1987).

Espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* têm capacidade de crescer nos tecidos relativamente secos das sementes e portanto em meios de alta concentração osmótica; este meio facilita sua cultura enquanto elimina uma vasta variedade de outros fungos de sementes menos hábeis de propagar-se com este balanço osmótico. Por outro lado, as sementes não germinam, o que facilita a identificação dos fungos no exame de sementes inteiras (KENNEDY, 1979; DEACON, 1984; BERJAK, 1987 a; COTTY, 1994).

O meio ácido de batata dextrose ágar (BDA) é sugerido por exercer controle sobre a população bacteriana que possa estar nas sementes enquanto que meio de ágar suco de tomate (AST) mais 6 % de cloreto de sódio é recomendado para a detecção de fungos de armazenamento

(NEERGAARD, 1979).

O método da placa de ágar apresenta alto custo e necessidade de equipamentos mais sofisticados de laboratório, sendo que o crescimento de fungos mais lentos pode ser encoberto por aqueles de crescimento mais rápido (NEERGAARD, 1979; ITO et al., 1992).

Em experimentos visando a detecção de fungos de armazenamento, a desinfestação é um procedimento que tem um papel importante por minimizar a ocorrência de gêneros oportunistas cujos esporos são veiculados pelo ar ou mesmo aderentes à semente na colheita e no transporte e que causam problemas na detecção do patógeno-alvo. A desinfestação de sementes pode ser em solução 2 % de hipoclorito de sódio (NaOCl) agitando vigorosamente para eliminar bolhas de ar por um minuto, após o que se enxágua as sementes em água esterilizada duas vezes, se escorre e se distribui as sementes no papel filtro ou nos meios de cultura (NEERGAARD, 1979; SAUER e BURROUGHS, 1986; MAUDE, 1996).

A desinfestação superficial das sementes tem como propósito a remoção de fungos e bactérias contaminantes instalados superficialmente na semente permitindo assim o crescimento de fungos internos da semente e a identificação destes nos meios de cultura. (NEERGAARD, 1979; SAUER e BURROUGHS, 1986; MAUDE, 1996).

A utilização de pré-tratamento como a esterilização superficial das sementes com cloro e o uso de meios seletivos visa permitir uma reprodutibilidade consistente dos resultados de laboratório e estabelecer uma acurada relação entre os testes e efeitos dos patógenos sobre a

semente (MAUDE, 1996).

O gênero *Rhizopus* é contaminante problemático devido ao seu crescimento rápido e agressivo sobre as sementes. ITO et al. (1992) em experimento com sementes de amendoim utilizaram-se do recurso de afastar com estilete o crescimento micelial vigoroso de *Rhizopus* no momento da avaliação.

2.1.3 Teste de Germinação de Sementes

O índice de germinação geralmente não revela problemas que patógenos possam causar à semente. Um lote pode estar dentro dos padrões de germinação exigidos mas também transportando microrganismos que não afetam a qualidade fisiológica das sementes nas condições de laboratório. Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* afetam a qualidade fisiológica da semente com redução do poder germinativo da mesma (também *Fusarium*) e podem causar a morte do embrião (MENTEN, 1995; POPINIGIS, 1985).

Segundo CHRISTENSEN (1972), os fungos que atacam sementes durante o armazenamento causam graus variados de deterioração que podem levar à morte da semente pelo ataque direto ou como resultado da produção de micotoxinas, enquanto que CARVALHO E NAKAGAWA (1983) colocam que a ação fúngica de redução da germinação das sementes se faz, essencialmente, devido à ação de uma ou mais toxinas.

2.1.4 Teor de Umidade em Sementes

O teor de umidade das sementes é o fator mais crítico no manuseio da semente, pois quanto menor o seu teor de umidade mais frágil e mais susceptível à quebra durante o beneficiamento. Além disso, nas condições ambientais do armazém ocorrem dois fatores importantes: a temperatura do ambiente e umidade relativa da atmosfera de armazenamento que podem afetar o teor de umidade de equilíbrio das sementes (WETZEL, 1987).

2.2 TRATAMENTO DE SEMENTES DE MILHO COM FUNGICIDAS

A importância do estudo do efeito protetivo de fungicidas na preservação de sementes de milho é devido à possibilidade de perda de viabilidade das mesmas sob condições de armazenamento adversas, particularmente em áreas tropicais e subtropicais, onde o clima estimula o crescimento de fungos. Para o sucesso de um tratamento químico de sementes é necessário conhecer os organismos a elas associados, a localização do patógeno nas sementes e a eficiência dos produtos disponíveis para o controle (BRADBURN et al., 1993; VITTI et al., 1993; MARTINEZ et al., 1994).

O tratamento de sementes de milho, quando realizado no momento de ensaque, visa a proteção contra fungos causadores de deterioração de sementes que vem sendo recomendado como uma das táticas de manejo das

principais doenças da espiga de milho no Rio Grande do Sul, especialmente para as podridões causadas por espécies de *Fusarium* (MENTEN, 1995; LUZ, 1995).

Podem ser usados no tratamento de sementes produtos sistêmicos ou de contato. Os primeiros penetram nos tecidos podendo erradicar as estruturas do patógeno que colonizam internamente a semente e os fungicidas de contato, relativamente insolúveis em água, protegem as partes tratadas externamente e atuam formando camada de proteção que inibe a germinação dos esporos fúngicos presentes na superfície da semente e daqueles que alcancem o local mais tarde por diferentes meios de disseminação. Estes fungicidas penetram diretamente nos esporos ou nos tubos germinativos dos fungos (DHINGRA et al., 1980; ZAMBOLIM et al., 1995).

No Brasil, o princípio ativo Thiabendazol está registrado no Ministério da Agricultura para o tratamento de sementes de milho para patógenos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (CDA, 1990). É um fungicida ao qual atribuem amplo espectro de ação, excelente atividade sistêmica e eficiência no tratamento de sementes, sendo recomendado para o controle de fungos internos a sementes com ação curativa e erradicante por eliminar as estruturas do patógeno no interior de tecidos (PICININI, 1994; ZAMBOLIM et al., 1995; GOULART, 1994; MENTEN, 1995).

O princípio ativo iprodione tem sua recomendação para tratamento de sementes sendo comercialmente oferecido em mistura com captan para

uso em sementes de trigo. No entanto, foi utilizado em experimentos por MARTINEZ e MANDUGANO (1985), HASAN (1993), WHITE JUNIOR (1994), LUZ (1996) e PINTO (1997) e proposto para a prevenção de infecção por fungos de armazenamento em milho, com grande efeito sobre as espécies de *Fusarium*, além da grande maioria de fungos patogênicos de sementes de milho, incluindo *Aspergillus* e *Penicillium*.

O tratamento de sementes pode servir para erradicar as infecções dos fungos de sementes, muito embora nem sempre seja necessário seu uso, mas pode fornecer proteção adicional em alguns anos de produção e os baixos custos econômicos e ecológicos levam a recomendação de uso deste tratamento (MAUDE, 1996).

Para se escolher o tratamento fungicida deve-se levar em conta o patógeno-alvo e suas particularidades, como a localização do micélio, que em espécies de *Fusarium* pode ser periféricamente localizado nas paredes apertadas do pericarpo ou invadir a semente vindo do sistema vascular via funículo, ou *Aspergillus flavus*, cujo micélio localiza-se mais profundamente dentro do tecido das sementes, nas proximidades das estruturas embrionárias, não sendo muito facilmente controlados com fungicidas (POPINIGIS, 1985, ANSELME, 1987; BERJAK, 1987 b).

2.3 ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

O armazenamento de sementes e grãos é essencial por manter estoques de uma safra para outra, além de conservar recursos genéticos,

sendo objetivo básico da armazenagem a manutenção da qualidade do produto. No Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais, o período médio de armazenamento de sementes comerciais, entre a colheita e semeadura para grandes culturas, varia entre 6 e 8 meses, sendo esta conservação por período curto auxiliada pelas baixas temperaturas do inverno (CARVALHO e NAKAGAWA, 1983; DHINGRA, 1985; McLEAN e BERJAK, 1985; BERJAK, 1987 a, b).

O declínio da qualidade e perda de viabilidade da semente já começa no campo, onde chuvas durante a maturação e colheita associados a ação de fungos, insetos, granizo e danos mecânicos reduzem a qualidade da mesma (McLEAN e BERJAK, 1985; BERJAK, 1987 a; BRADBURN et al., 1993).

A temperatura e a umidade do produto são fatores que interagem afetando a umidade de equilíbrio da semente e podendo reduzir a qualidade das mesmas, em determinado tempo de armazenagem. A elevação da temperatura pode favorecer a atividade de insetos e fungos e acelerar processo de deterioração das mesmas principalmente em países tropicais e subtropicais (POPINIGIS, 1985, BERJAK, 1987 a; BRADBURN et al., 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias (SCA), Universidade Federal do Paraná (UFPr), com sementes de milho híbrido CARGILL, C-701 da safra 94/95.

A detecção de fungos nas sementes, nos testes preliminares, foi pelo Blotter em placas plásticas e no meio ácido de Batata Dextrose Ágar (BDA) com sementes inteiras e meias. Foram feitos os testes de germinação e determinação do teor de umidade das sementes.

Aos 90, 150, 210 e 270 dias após armazenamento (DAA) usou-se o Blotter em gerbox e os meios ácido de Batata Dextrose Ágar (BDA) e Ágar Suco de Tomate (AST) mais 6 % de cloreto de sódio (NaCl), assim como testes de germinação e determinação do teor de umidade .

Foram identificados os gêneros dos fungos incidentes nas sementes, feita a contagem das sementes com fungos e determinada a percentagem de germinação e teor de umidade das mesmas. Foram usadas as seguintes metodologias.

3.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE FUNGOS

Com o objetivo de qualificar a microflora incidente nas sementes de milho, ao recebimento, procedeu-se exame sanitário das sementes utilizando-se o método do papel filtro ou teste do Blotter e o meio de cultura ácido de batata dextrose ágar (BDA).

3.1.1 Testes Preliminares - Preparo do Material

As placas plásticas e gerbox utilizados foram antecipadamente desinfestados por mergulhia em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2 %, enxugadas em papel toalha, fechadas e acondicionadas em sacos de plástico internamente desinfestados na mesma solução.

O papel filtro utilizado como substrato foi recortado na dimensão interna das placas plásticas e esterilizado em forno por duas horas à temperatura de 220 °C, sendo usado água esterilizada a 120 °C em autoclave, por 20 minutos à 1,5 atm. de pressão.

As sementes foram lavadas em solução à 2 % de hipoclorito de sódio de acordo com SAUER e BURROUGHS (1986).

3.1.2 Teste do Blotter

As sementes após lavagem superficial com hipoclorito de sódio foram dispostas sobre três folhas de papel-filtro úmido em placas de petri

de plástico transparente com pinça mergulhada em álcool e flambada. Utilizou-se 10 sementes equidistantes entre si, em cada placa, trabalhando-se em câmara de fluxo laminar, desinfestada com álcool a 70 %..

Foram utilizadas sementes inteiras e meias sementes, sendo estas seccionadas pelo embrião com lâmina flambada e descartada uma das metades enquanto a outra metade foi colocada sobre o papel-filtro. Cada placa recebeu 10 sementes e foram feitas oito repetições para sementes inteiras e meias sementes.

As sementes plaqueadas foram colocados sob iluminação, fotofase 12 horas, à temperatura ambiente (20 ± 2 °C), conforme recomenda NEERGAARD (1979) e ao sétimo dia foi feita a contagem das sementes colonizadas por fungos e identificação dos gêneros de fungos de armazenamento presentes em microscópio estereoscópio.

3.1.3 Meio de Cultura Ácido de Batata Dextrose Ágar (BDA)

Utilizou-se o meio de cultura ácido de batata dextrose ágar (BDA) com composição: extrato de batata (200 g), dextrose (20 g), ágar (16 g), água destilada (1000 ml q.s.p.) e após autoclavagem acrescentou-se 16 ml de ácido láctico a 85 %.

Nas placas de Petri com os meios de cultura colocou-se 10 sementes de milho equidistantes entre si, tendo sido feitas oito repetições em meio de cultura de sementes inteiras e de meias sementes.

As placas de Petri com as sementes foram colocadas nas mesmas condições que as usadas para o teste do Blotter e avaliadas da mesma forma.

3.1.4 Teste de Germinação

Os testes de germinação foram realizados de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), utilizando-se 400 sementes de milho. Foram feitas quatro repetições de dois rolos de 50 sementes cada, colocadas em germinador à temperatura de 25°C. A avaliação da germinação foi feita no sétimo dia.

3.1.5 Determinação da Umidade das Sementes

Para a determinação da umidade em sementes, utilizou-se do método direto da estufa onde, após a pesagem as sementes são colocadas em estufa pré-aquecida à 103 °C ± 2 °C conforme Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) pelo período de 72 horas. Após este período, as amostras foram retiradas da estufa, esfriadas em dessecador e pesadas. O teor de umidade das sementes foi obtido através de cálculo e expresso em base úmida, sendo utilizada a fórmula:

$$\% \text{ de Umidade}(U) = \frac{100(P-p)}{P-t}$$

onde: P= peso inicial (peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida), p= peso final (peso do recipiente mais o peso da semente seca) e t= tara (peso do recipiente com sua tampa).

3.2 TRATAMENTO DE SEMENTES COM FUNGICIDAS

Após os testes preliminares, as sementes foram divididas em três lotes de 15 kg cada um, os quais foram condicionados em sacos de papel kraft multifoliado e receberam a identificação de sementes não tratadas (SNT); de sementes tratadas com Iprodione (STI) e de sementes tratadas com Thiabendazol (STT).

Para os testes, foram coletadas amostras do material de cada um dos lotes: SNT, STI e STT aos 90, 150, 210 e 270 DAA para a avaliação da incidência de fungos de armazenamento nas sementes.

No lote STI, utilizou-se 30 g de Iprodione (50% p. a.) para 15 kg de sementes com adição de 20 ml de água por quilo de semente, para garantir cobertura uniforme, sem molhamento excessivo das sementes (DHINGRA et al., 1980) e para o lote STT foi utilizado 15 g de Thiabendazol (10 % p.a.) nas mesmas condições.

3.3 ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES DE MILHO

As sementes de milho, dos três lotes SNT, STI e STT foram, após o tratamento, acondicionadas em sacos de papel kraft e armazenadas em condição ambiente por 270 dias, sendo retiradas amostras aos 90 dias e com o intervalo de 60 dias para os testes de sanidade, de germinação e de determinação de umidade, nas sementes tratadas e não tratadas.

3.4 DETECÇÃO DE FUNGOS NAS SEMENTES ARMAZENADAS

3.4.1 Teste do Blotter

As sementes não tratadas (SNT) passaram por lavagem superficial com solução à 2 % de hipoclorito de sódio, sendo que em cada gerbox sobre o papel-filtro úmido foram colocadas 25 sementes em cinco carreiras equidistantes dos lotes SNT, STI e STT (Figura 1).

Foram utilizadas 150 sementes de cada tratamento SNT, STI e STT plaqueadas em dois gerbox com 25 sementes para cada uma das três repetições.

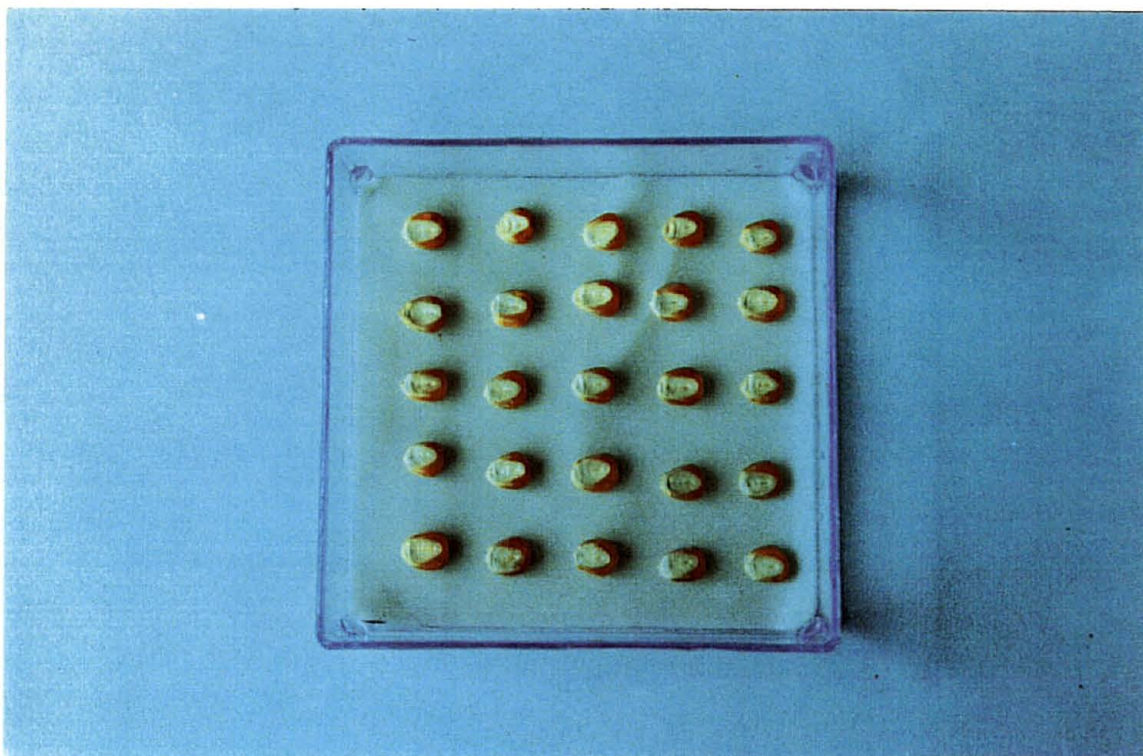


Figura 1 - Teste do Blotter, disposição das sementes das milho em gerbox com substrato de papel-filtro, em carreiras equidistantes. UFPR. Curitiba. PR. 1996.

3.4.2 Meios de Cultura

O meio ácido de BDA foi preparado do mesmo modo que nos testes preliminares e a composição do meio de ágar suco de tomate (AST) foi ágar (16 g), suco de tomate industrializado puro (200 ml), cloreto de sódio (60 g), carbonato de cálcio (3 g) e água esterilizada (800 ml).

Os meios de cultura foram autoclavados por 20 min a 120 °C a 1,5 atm. de pressão e vertidos nas placas de Petri de vidro após estas terem passado por autoclavagem nas mesmas condições dos meios, lavadas e embaladas em papel para a esterilização em forno por 4 h à 250 °C.

Após a lavagem das sementes do lote SNT em solução de hipoclorito de sódio a 2 %, estas foram plaqueadas nos meios, em câmara de fluxo laminar. Foram feitas três repetições com duas placas de petri com 15 sementes em cada placa, totalizando 90 sementes em BDA e 90 em AST, para cada um dos três lotes (Figuras 2 e 3).

Os gerbox e as placas de Petri, foram colocados sob iluminação, fotofase 12 horas, a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) e ao sétimo dia, foi feita a contagem de sementes colonizadas e identificação dos fungos presentes em microscópio estereoscópio.

3.4.3 Teste de Germinação e Determinação do Teor de Umidade das Sementes

Foram realizados do mesmo modo que nos testes preliminares, como o recomendado pela Regra para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

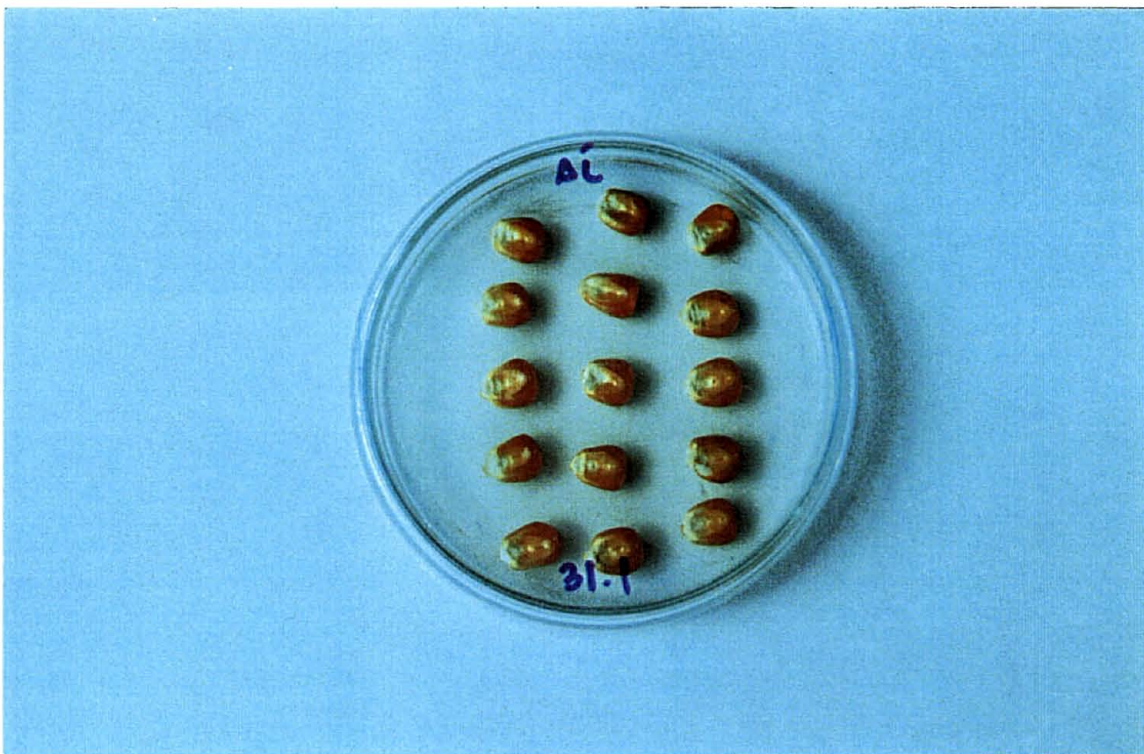


Figura 2 - Disposição das sementes de milho em placas de Petri com meio de batata dextrose ágar (BDA). UFPR. Curitiba. PR. 1996.

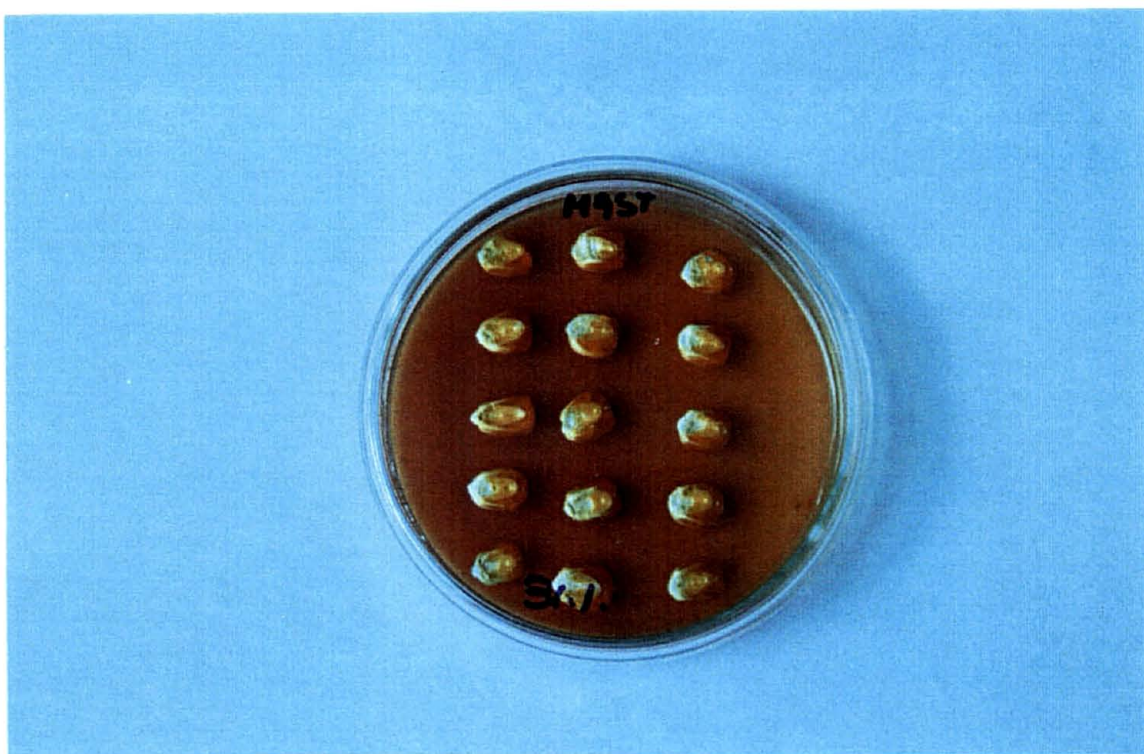


Figura 3 - Disposição das sementes de milho em placas de Petri em meio de ágar suco de tomate (AST). UFPR. Curitiba. PR. 1996.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os dados foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizado com 9 tratamentos e três repetições. Os tratamentos testados resultaram do arranjo fatorial 3 x 3 dos métodos de incubação: nos meios de cultura de BDA e AST e pelo teste do Blotter e nos tratamentos de sementes com Iprodione (STI), com Thiabendazol (STT) e não tratadas (SNT), nos arranjos que podem ser verificados na Tabela 1.

Foram feitas três repetições, cada um com duas placas de Petri nos meios de cultura BDA e AST, com 15 sementes em cada uma. No teste Blotter cada repetição com dois gerbox de 25 sementes em cada um, em três repetições.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos e dos métodos de incubação utilizados nas sementes de milho. UFPR. Curitiba. PR. Junho/1995.

Código	TRATAMENTOS	MÉTODOS DE DETECÇÃO
T ₁	SNT	BDA
T ₂	STI	BDA
T ₃	STT	BDA
T ₄	SNT	AST
T ₅	STI	AST
T ₆	STT	AST
T ₇	SNT	Blotter
T ₈	STI	Blotter
T ₉	STT	Blotter

Os resultados foram submetidos a análise de variância pelo Teste de Bartlett quanto a 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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS DOS TESTES PRELIMINARES

Foram encontrados nos testes preliminares, da mesma forma que os experimentos de LUZ (1995) e REIS e CASA (1996), os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* como os mais freqüentes em sementes de milho (Tabela 2). Além destes, o gênero *Trichoderma* em 5 % das sementes inteiras no meio BDA e *Rhizopus* spp (2,5 %) pelo teste do Blotter, sendo estes dois últimos considerados como contaminantes (HENNING, 1997).

Tabela 2 - Incidência de fungos em sementes de milho inteiras e meias sementes avaliadas pelo meio de cultura de BDA e pelo Blotter. 1º DAA. UFPR. Curitiba. PR. Julho/ 1995.

MÉTODOS	SEMENTES			
	INTEIRAS		MEIAS SEMENTES	
	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
BDA ¹	75,0 ³	20,0	76,3	13,8
BLOTTER ²	42,5	10,0	40,0	28,8

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

³ Percentagem média de incidência de fungos em sementes de milho

Não foi observado nos métodos utilizados, a incidência do gênero *Aspergillus*.

O uso de sementes cortadas longitudinalmente pelo embrião (WETZEL, 1987) pode favorecer o crescimento de fungos, no entanto devido a maior demanda de tempo e de trabalho em relação ao uso de sementes inteiras, optou-se pelo uso destas que agilizavam o trabalho.

Com relação a germinação foi obtido a média de 97,5 % , sendo que o teor de umidade foi em média de 10,8 %.

Baseados nos gêneros encontrados optou-se pelo uso do teste do Blotter e dos meios de cultura BDA e AST pela particularidade dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* crescerem num meio salino (são halofílicos) e inibirem o desenvolvimento de outros fungos, facilitando a leitura. NEERGAARD (1979) recomenda, pelas características do gênero *Aspergillus*, o uso de meios de cultura de alta concentração osmótica, que pode ser obtido quando se adiciona cloreto de sódio ou sacarose.

4.2 DETECÇÃO DO GÊNERO *Penicillium* E EFEITOS DO TRATAMENTO FUNGICIDA

O teste de homogeneidade das variâncias mostrou a necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada de $x + 1$, sendo x a percentagem de sementes com fungos.

4.2.1 Avaliação aos 90 DAA (Dias Após Armazenagem)

Na avaliação feita aos 90 DAA (dias após armazenagem) as variáveis métodos de detecção e tratamento com fungicida não foram independentes, pois sua interação foi significativa ($p < 0,05$).

Na Tabela 3, é apresentado o resultado da comparação de médias dos tratamentos do teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Verificou-se que a maior expressão da população do gênero *Penicillium* foi pelos métodos de detecção em BDA e Blotter que não diferiram estatisticamente entre si, nas sementes não tratadas (SNT).

Não foram observadas diferenças estatísticas para os três métodos testados nas sementes tratadas com Iprodione e Thiabendazol.

Tabela 3 - Incidência do gênero *Penicillium* em sementes de milho nos meios BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 90 DAA. UFPr. Curitiba. PR. Outubro/ 1995.

LOTES	MÉTODOS								
	BDA ¹			AST ²			BLOTTER ³		
Não Tratadas (SNT)	15,6 ⁴	A ⁵	a ⁵	6,6	B	a	22,7	A	a
Tratadas Iprodione (STI)	2,2	A	b	0,0	A	b	1,1	A	b
Tratadas Thiabendazol (STT)	2,2	A	b	2,2	A	ab	2,2	A	b

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

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

Dentro dos métodos testados, no BDA e Blotter a maior população de fungos foi detectada em sementes não tratadas e não houve diferenças estatísticas entre as sementes tratadas com Iprodione e Thiabendazol,

No meio AST as populações do fungo nas sementes não tratadas não diferiram estatisticamente daquelas tratadas com Thiabendazol, o que sugere que este não foi eficaz no controle do fungo. Por outro lado, como este meio mostrou baixa eficiência na detecção do gênero deve-se considerar cuidadosamente o resultado.

As menores incidências foram obtidas em BDA e Blotter para os lotes tratados com fungicidas e não diferiram estatisticamente entre si. Considerando que o gênero *Penicillium* requer teores mais altos de umidade (16,5 %), o Blotter e BDA podem ter favorecido o desenvolvimento deste, enquanto que o mesmo não ocorre com AST pela concentração de cloreto de sódio que o compõe. Em estudo de três espécies do gênero *Penicillium*, KEROMNES e PELHATE (1988) verificaram que tinham características ecológicas específicas em relação à tolerância à seca e ao crescimento em substratos secos, competitividade e dominância entre as espécies e preferência por calor e fraca competição, de forma que predominavam em diferentes regiões climáticas da França.

Quanto aos tratamentos com fungicidas em cada um dos métodos, o teste mostrou que as sementes dos lotes STI e STT, apresentaram as menores infestações do gênero, sendo que as sementes tratadas com Thiabendazol, no meio de AST, foi o que forneceu melhores resultados.

Comparando-se as percentagens de incidência de *Penicillium* nas

sementes tratadas com fungicidas (STI e STT), observou-se que o uso de fungicidas teve ação sobre os fungos presentes nas sementes sendo este efeito observado aos 90 DAA.

4.2.2 Avaliação aos 150 DAA (Dias Após Armazenagem)

Na avaliação realizada aos 150 DAA, as variáveis métodos de detecção e tratamento de sementes não foram independentes (Anexo 1), pois sua interação foi significativa ($p < 0,05$).

Na Tabela 4 tem-se o resultado da comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 4 - Incidência do gênero *Penicillium* em sementes de milho nos meios BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 150 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Dezembro/ 1995.

LOTES	MÉTODOS			
	BDA ¹		AST ²	BLOTTER ³
Não Tratadas (SNT)	17,7 ⁴	AB ⁵ a ⁵	14,4 B a	23,5 A a
Tratadas Iprodione (STI)	0,0	A b	0,0 A b	0,8 A b
Tratadas Thiabendazol (STT)	0,0	A b	0,0 A b	0,8 A b

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

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

Nas sementes não tratadas, os resultados do Blotter não diferiram estatisticamente dos em BDA repetindo os resultados obtidos aos 90 DAA.

Não houve diferenças entre os métodos usados para detecção, do mesmo modo que aos 90 DAA nas sementes tratadas com Iprodione e com Thiabendazol. Na comparação dos resultados de sementes não tratadas, pode-se considerar que o desenvolvimento do gênero *Penicillium* foi restrito com as aplicações dos fungicidas Iprodione e Thiabendazol até os 150 DAA.

Para a detecção de *Penicillium*, o Blotter permitiu detectar incidências maiores do gênero, embora não diferindo de BDA. Do mesmo modo, PEREIRA (1994) detectou as maiores percentagens deste fungo no Blotter, sugerindo que isto se deva ao fato de colonizarem a semente externamente.

Nos valores obtidos aos 90 e 150 DAA verificou-se que as populações de *Penicillium* nas sementes não tratadas se mantiveram e as sementes tratadas com Iprodione e Thiabendazol apresentaram as percentagens mais baixas do gênero em questão.

4.2.3 Avaliação aos 210 DAA (Dias Após Armazenagem)

Na avaliação realizada aos 210 DAA, as variáveis método de detecção e tratamento de sementes não foram independentes (Anexo 1) pois sua interação foi significativa ($p < 0,01$).

Na Tabela 5 está apresentado o resultado da comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Aos 210 DAA para sementes não tratadas, o melhor método foi o do Blotter para a detecção do gênero *Penicillium*, sendo que entre os meios de BDA e AST não houve diferenças significativas entre os resultados.

Foi verificada a incidência do gênero *Trichoderma* (1,7 %) na avaliação aos 210 dias no meio BDA, no lote das sementes não tratadas, o que pode ter afetado os resultados pois este gênero produz antibióticos e é estudado como agente potencial de controle biológico de fungos em sementes e assim como o próprio gênero *Penicillium*, portanto devem ocorrer interações entre as populações incidentes na semente, de natureza antagônica ou competitiva conforme o sugerido por MENTEN (1995).

Tabela 5 - Incidência do gênero *Penicillium* em sementes de milho nos meios BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 210 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Fevereiro/ 1996.

LOTES	MÉTODOS						
	BDA ¹			AST ²		BLOTTER ³	
Não Tratadas (SNT)	6,6 ⁴	B ⁵	a ⁵	6,6	B b	16,4	A a
Tratadas Iprodione (STI)	2,2	A	ab	2,2	A b	7,8	A ab
Tratadas Thiabendazol (STT)	1,1	B	b	15,5	A a	2,4	B b

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

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

A população de *Penicillium* se manteve durante o período de armazenamento; considerando-se o melhor método (Blotter) em SNT, este resultado pode ser justificado pela crescente incidência de *Aspergillus* ocasionando fenômeno de competitividade entre os dois gêneros (VECCHIATO et al., 1994; MENTEN, 1995).

Aos 210 DAA, nas sementes de milho foram encontrados os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* sobre uma mesma semente; para fins de avaliação considerou-se o gênero dominante na região da camada negra da cariopse (WETZEL, 1987; McLEAN e BERJAK, 1985).

Nas sementes tratadas com Iprodione não houve diferença estatística entre os três métodos de detecção, muito embora o Blotter tenha detectado 3,5 vezes mais a incidência do que os meios de cultura.

O melhor meio foi ágar suco de tomate nas sementes tratadas com Thiabendazol.

Os teores de umidade de semente exigidos por *Penicillium* estão acima de 16,5 % (KEROMNES e PELHATE, 1988, REIS e CASA, 1996), assim podem ter se desenvolvido pela umidade que os substratos BDA e Blotter forneceram. Espécies de *Aspergillus* crescem a teores de umidade mais baixos (13,5 %), porém com crescimento muito rápido acima deste valor e à medida que colonizam as sementes, produzem calor e umidade metabólica que favorecem a sucessão das espécies e de gêneros de fungos. Assim pode ter ocorrido uma alteração do micro ambiente da semente o que propiciou o crescimento do *Penicillium*.

Aos 210 DAA, a incidência de *Penicillium* observada nas sementes

não tratadas e tratadas com Thiabendazol e Iprodione demonstrou que a aplicação de fungicidas levou a uma restrição do desenvolvimento do fungo, com exceção das sementes tratadas com Thiabendazol no meio AST (15,5 %), o que pode ser devido a incidência de *Aspergillus* (20,0 %).

4.2.4 Avaliação aos 270 DAA (Dias Após Armazenagem)

A variável método de detecção foi independente (Anexo 1) e variável tratamento de sementes não foi independente pois sua interação foi significativa ($p < 0,01$). Na Tabela 6, está apresentado o resultado da comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 6 - Incidência do gênero *Penicillium* em sementes de milho nos meios BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Abril/ 1996.

LOTES	MÉTODOS			MÉDIAS
	BDA ¹	AST ²	BLOTTER ³	
Não Tratadas (SNT)	6,6 ⁴	6,6	9,5	7,6 b ⁵
Tratadas Iprodione (STI)	1,1	1,1	17,5	6,6 b
Tratadas Thiabendazol (STT)	64,4	50,0	24,6	46,3 a
MÉDIAS	24,05 A ⁵	19,23 A	17,23 A	

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

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

O teste de comparação de médias mostrou que para as sementes não tratadas e tratadas com os fungicidas Iprodione e Thiabendazol não ocorreram diferenças significativas entre os três métodos de detecção.

As sementes não tratadas e as tratadas com o fungicida Iprodione (STI) nos meios de cultura BDA e AST apresentaram as menores incidências do gênero e não diferiram estatisticamente entre si.

A diferença de incidência de *Penicillium* (46,3 %) nas sementes tratadas com Thiabendazol quando comparada com as sementes não tratadas (7,6 %) pode ser devido à características do Thiabendazol que pode se decompor em outros produtos fungitóxicos ou perdido seu efeito residual quando exposto às condições de ambiente. Além disso, alguns produtos precisam da água livre da semente para exercerem sua ação fungicida ou fungistática, o que não ocorre em sementes quando armazenadas à umidade relativa de cerca de 75 %. Assim, ou devido a perda de ação do fungicida ou por este não estar ativo, os propágulos, as hifas ou os esporos que chegassem ao local encontrariam a semente como substrato livre de competidores e proliferar-se rapidamente. Fungicidas sistêmicos como o Thiabendazol são indicados para o tratamento de sementes pela proteção que oferecem à plântula contra patógenos de solo mais do que pela proteção contra fungos de armazenamento em sementes (DHINGRA et al., 1980; MORENO et al., 1988; ZAMBOLIM et al., 1995; MENTEN, 1995).

Aos 270 dias pelo Blotter no lote das sementes não tratadas, foi verificada a incidência do gênero *Trichoderma* (0,5 %), o qual está entre

os microrganismos com capacidade de produzir antibióticos, sendo utilizado em controle biológico de alguns fungos, portanto podendo afetar o desenvolvimento de fungos em sementes.

As menores incidências de *Penicillium* nas sementes não tratadas em relação às tratadas com Thiabendazol pode ser devido à crescente população de *Aspergillus* sobre as mesmas, competindo entre si, além disso quanto mais as sementes ficam debilitadas mais se tornariam susceptíveis ao ataque de fungos (BERJAK, 1987 a).

Pelo Gráfico 1, pode-se verificar a incidência de *Penicillium* pelos métodos utilizados e o efeito dos fungicidas nas épocas avaliadas.

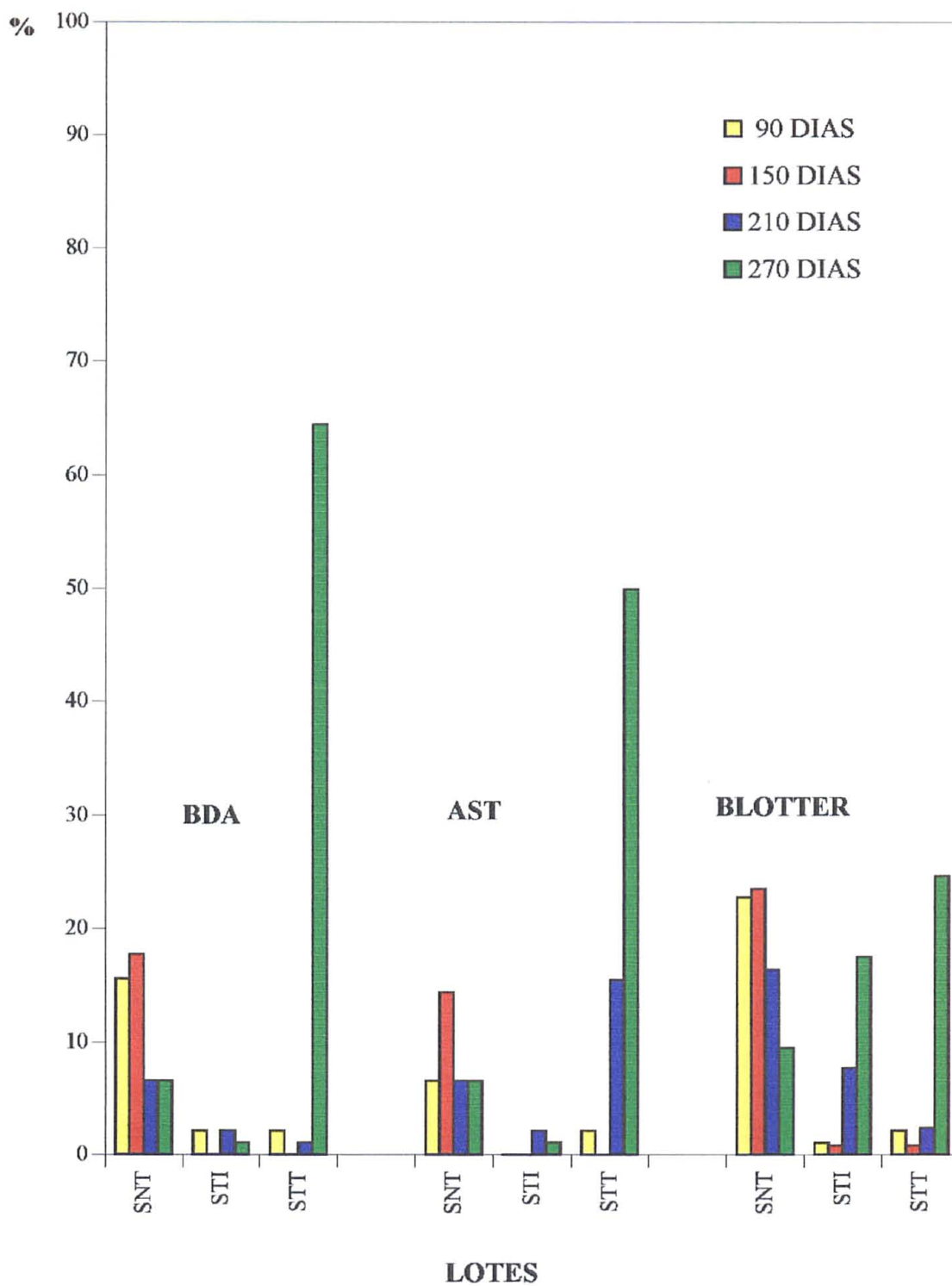


Gráfico 1 - Incidência do gênero *Penicillium* em sementes de milho nos meios de cultura de BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. Aos 90, 150, 210, 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Junho/1995 a Abril/1996.

4.3 DETECÇÃO DO GÊNERO *Aspergillus* E EFEITOS DO TRATAMENTO FUNGICIDA.

Na avaliação dos fungos presentes nas sementes de milho, ao recebimento das sementes não foi constatado o gênero *Aspergillus* pela metodologia utilizada; no entanto este gênero costuma proliferar-se durante o armazenamento.

Para a avaliação 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.

4.3.1 Avaliação aos 90 DAA (Dias Após Armazenagem)

Aos 90 DAA foi verificado a incidência média do gênero *Aspergillus* pelo teste do Blotter; nas sementes não tratadas. Este resultado pode estar relacionado às maiores incidências de *Penicillium*, debilitando a semente e predispondo a mesma a outros fungos (BERJAK, 1987 a).

Nas sementes tratadas com Iprodione e Thiabendazol (STI e STT) as percentagens encontradas foram consideradas baixas, pois em sementes recém-colhidas podem ser obtidos em torno de 1,0 % de fungos de

Tabela 7 - Incidência do gênero *Aspergillus* em sementes de milho nos meios BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 90 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Outubro/ 1995.

LOTES	BDA ¹	MÉTODOS AST ²	BLOTTER ³
Não Tratadas (SNT)	0,0 ⁴	1,1	7,2
Tratadas Iprodione (STI)	0,0	1,1	0,0
Tratadas Thiabendazol (STT)	0,0	0,0	0,3

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

armazenamento (KENNEDY,1979;WETZEL,1987).

O Blotter, nesta avaliação (Tabela 7) detectou a maior incidência de *Aspergillus*, não sendo possível avaliar os efeitos dos fungicidas.

O gênero *Aspergillus* não foi detectado ao início do armazenamento, no entanto foi constatada a sua presença aos 90 DAA.

4.3.2 Avaliação aos 150 DAA (Dias Após Armazenagem)

Aos 150 DAA (Tabela 8) a incidência de *Aspergillus* foi verificada pelo teste do Blotter nas sementes não tratadas.

As incidências do gênero *Aspergillus* não permitiram observar diferenças entre os métodos de detecção e nos tratamentos de sementes. VECCHIATO et al. (1994) observaram que ocorreu um aumento de

Tabela 8 - Incidência do gênero *Aspergillus* em sementes de milho nos meios BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 150 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Dezembro/ 1995.

LOTES	BDA ¹	MÉTODOS	
		AST ²	BLOTTER ³
Não Tratadas (SNT)	0,0 ⁴	0,0	5,1
Tratadas Iprodione (STI)	0,0	3,3	0,0
Tratadas Thiabendazol (STT)	0,0	1,1	0,0

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

Aspergillus, em sementes de feijão não tratadas e armazenadas em condições ambientais, naqueles lotes que foram avaliados e detectados o gênero ao início do armazenamento.

4.3.3 Avaliação aos 210 DAA (Dias Após Armazenagem)

Na avaliação realizada aos 210 DAA, (Anexo 2) as variáveis métodos de detecção e tratamento de sementes não foram independentes pois a interação foi significativa ($p < 0,01$).

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

O resultado do teste de comparação de médias, mostra o meio de AST

Tabela 9 - Incidência do gênero *Aspergillus* em sementes de milho nos meios de BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 210 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Fevereiro/ 1996.

LOTES	MÉTODOS						
	BDA ¹			AST ²		BLOTTER ³	
Não Tratadas (SNT)	3,3 ⁴	B ⁵	a ⁵	41,1	A a	5,1	B a
Tratadas Iprodione (STI)	2,2	A	a	0,0	A c	3,1	A a
Tratadas Thiabendazol (STT)	1,1	B	a	20,0	A b	0,7	B a

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

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

detectando a percentagem de 41,1 % do patógeno-alvo, nas sementes não tratadas e 20,0 % nas tratadas com Thiabendazol caracterizando o meio AST como o melhor para a detecção do gênero, resultado que coincide com a recomendação de NEERGAARD (1979); BERJAK (1984); WETZEL (1987), pela sua alta concentração osmótica deste meio.

Não houve diferença estatística entre os três métodos de detecção nas sementes tratadas com Iprodione, em baixas incidências não puderam ser verificadas diferenças entre os métodos utilizados.

Aos 210 DAA, 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; McLEAN e BERJAK, 1987).

Os resultados obtidos para STI em AST, devem considerar que a incidência de *Penicillium* aos 210 DAA, no mesmo meio foi de 15,5 %, podendo estar competindo com *Aspergillus* e alterando ou degradando os produtos fungicidas.

No meio de BDA e pelo Blotter as sementes tratadas com Thiabendazol, Iprodione e não tratadas não foram apresentaram diferenças significativas na detecção do gênero *Aspergillus* em sementes de milho. No entanto, no AST as menores incidências foram verificadas nas sementes tratadas com Iprodione.

4.3.4 Avaliação aos 270 DAA (Dias Após Armazenagem)

O teste de homogeneidade das variâncias mostrou a necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada de $x + 1$, sendo x a percentagem de sementes infestadas com fungos.

Na avaliação realizada aos 270 DAA, (Anexo 2) as variáveis métodos de detecção e tratamento de sementes não foram independentes, pois a interação foi significativa ($p < 0,01$).

Na Tabela 10 está apresentado o resultado da comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Aos 270 DAA, verificou-se a incidência do gênero *Aspergillus* nas sementes não tratadas no meio de AST e no teste do Blotter que não diferiram entre si.

Tabela 10 - Incidência do gênero *Aspergillus* em sementes de milho nos meios BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Abril/ 1996.

LOTES	MÉTODOS							
	BDA ¹			AST ²		BLOTTER ³		
Não Tratadas (SNT)	21,0 ⁴	B ⁵	a ⁵	66,2	A a	79,7	A a	
Tratadas Iprodione (STI)	0,0	B	b	26,6	A b	2,6	B b	
Tratadas Thiabendazol (STT)	22,2	C	a	36,6	B b	68,4	A a	

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

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

O meio de AST se mostrou o melhor para sementes tratadas com Iprodione não ocorrendo diferenças significativas entre BDA e Blotter.

O teste do Blotter, para o bloco STT, foi o que detectou maior percentagem de *Aspergillus*.

Em BDA, AST e Blotter as sementes tratadas com iprodione apresentaram as menores incidências do fungo.

No meio de AST, as sementes tratadas com Thiabendazol não se diferenciaram das tratadas com Iprodione.

Aos 270 DAA, as sementes tratadas com Thiabendazol e não tratadas, no Blotter e no BDA, apresentaram resultados que não diferiram estatisticamente, estas percentagens podem ser devidas ao processo de deterioração das sementes não tratadas, cujo aumento na temperatura e

umidade apressam o desenvolvimento dos fungos e para as tratadas com Thiabendazol, pode ser pela perda ou redução do poder fungicida do produto (WHITE et al., 1993).

Da mesma forma que aos 210 DAA, nesta avaliação quando da incidência conjunta de *Penicillium* e *Aspergillus*, o gênero predominante na região da camada negra é que foi considerado (WETZEL, 1987; McLEAN e BERJAK, 1987).

Verificou-se aumento na incidência do gênero *Aspergillus* no período de armazenagem. CHRISTENSEN e KAUFMANN (1969), colocaram que este gênero podendo proliferar-se até ser virtualmente isolado de cada semente. Este comportamento pode ser acompanhado pelo Gráfico 2, onde os valores percentuais mostraram que a proliferação de fungos foi um processo crescente durante o armazenamento.

O meio de AST com 6 % de cloreto de sódio, permitiu o crescimento do gênero *Aspergillus*, o qual necessita meios com alta concentração osmótica para o seu crescimento.

O BDA não foi eficiente para o isolamento de *Aspergillus* das sementes de milho devido as características próprias deste meio de cultura.

As incidências do fungo em sementes tratadas com Thiabendazol podem ser explicadas pelo estudo de WHITE et al. (1993) que colocam as altas percentagens de *Penicillium* podendo tornar as sementes susceptíveis às espécies de *Aspergillus*, assim os fungicidas pareceriam ineficazes. Para estes autores os fungicidas poderiam degradar mais rapidamente em experimentos e não dariam bons resultados e assim o Thiabendazol não

faria um controle total sobre os fungos de armazenamento. Este controle de fungos poderia ser incrementado pela melhor distribuição nas sementes.

LUZ (1996) obteve com tratamento de Thiabendazol mais captan, entre 51 a 75 % de efeito sobre *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* e espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. VON PINHO (1995) utilizou a mistura de metalaxil mais Thiabendazol, que embora não erradicasse espécies de *Aspergillus*, reduziu sua incidência.

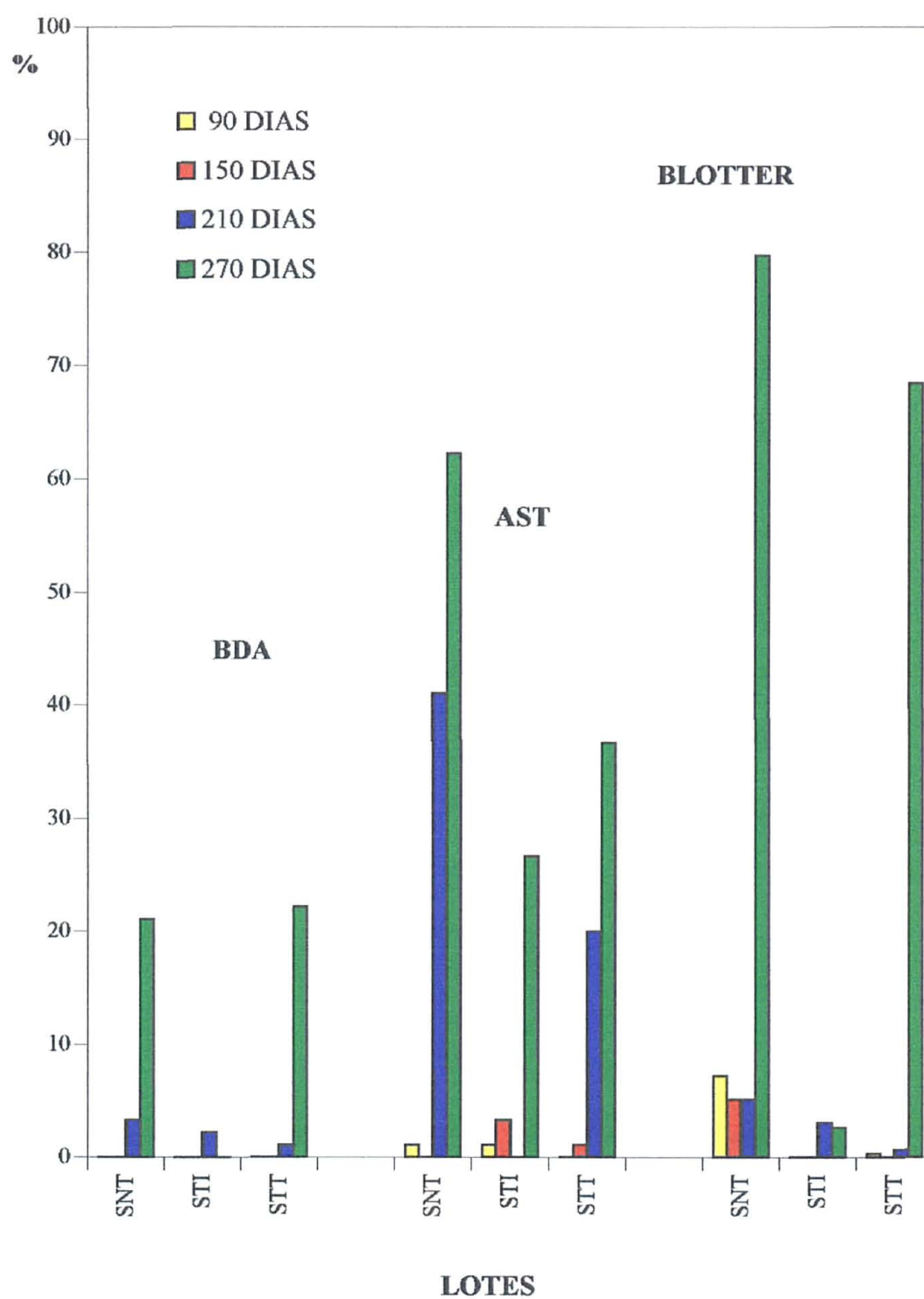


Gráfico 2 - Incidência do gênero *Aspergillus* em sementes de milho nos meios de BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. Aos 90, 150, 210, 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Junho/1995 a Abril/1996.

4.4 DETECÇÃO DO GÊNERO *Fusarium* E EFEITOS DO TRATAMENTO FUNGICIDA.

O teste de homogeneidade das variâncias mostrou a necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada de $x + 1$, sendo x a percentagem de sementes infestadas com fungos.

4.4.1 Avaliação dos 90 DAA (Dias Após Armazenagem)

Na avaliação realizada aos 90 DAA (Anexo 3) as variáveis métodos de detecção e tratamento de sementes não foram independentes pois a interação foi significativa ($p < 0,01$).

Na Tabela 11, está apresentado o resultado da comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

O gênero *Fusarium* está colocado na categoria dos fungos intermediários que incidiriam nas sementes apenas ao início da armazenagem; assim foram feitas duas avaliações do gênero *Fusarium*, aos 90 e aos 270 dias.

Na Tabela 11, aos 90 dias, os lotes SNT e STI apresentaram no de BDA a maior percentagem de sementes infestadas com *Fusarium*, sendo que pelo teste de comparação de médias não ocorreram diferenças significativas entre o meio AST e pelo Blotter. Para o lote STT ocorreram diferenças significativas entre os três métodos de detecção tendo sido a maior

Tabela 11 - Incidência do gênero *Fusarium* em sementes de milho nos meios BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 90 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Outubro/ 1995.

LOTES	MÉTODOS						
	BDA ¹			AST ²		BLOTTER ³	
Não Tratadas (SNT)	71,1 ⁴	A ⁵	a ⁵	55,5	B a	53,0	B a
Tratadas Iprodione (STI)	64,4	A	ab	34,4	B b	44,3	B a
Tratadas Thiabendazol (STT)	57,7	A	b	24,3	B c	16,9	C b

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

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

percentagem de *Fusarium* obtida nos meios de BDA e AST.

O meio de BDA se mostrou o melhor para a detecção de *Fusarium* nos três lotes de sementes.

Em relação ao controle do patógeno, o lote tratado com Thiabendazol (STT) aos 90 dias foi o que apresentou os melhores resultados verificados nos três métodos, sendo que no meio de BDA os resultados obtidos não se diferenciaram significativamente do lote STI.

As sementes não tratadas e tratadas com Iprodione apresentaram-se com infestações de *Fusarium*, sendo que nas sementes tratadas com Thiabendazol apresentaram menor incidência, VON PINHO et al. (1995), encontraram o mesmo resultado usando o Thiabendazol em mistura com metalaxil.

4.4.2 Avaliação dos 270 DAA (Dias Após Armazenagem)

Na avaliação realizada aos 270 DAA (Anexo 3) as variáveis métodos de detecção e tratamento de sementes não foram independentes, pois a interação foi significativa ($p < 0,01$).

Na Tabela 12, está apresentado o resultado da comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Foram verificadas diferenças significativas entre os meios de cultura de BDA e AST e pelo teste do Blotter, sendo a maior incidência de *Fusarium* detectada pelo meio BDA nas sementes não tratadas (SNT),

A detecção de *Fusarium* nas sementes tratadas com Iprodione e Thiabendazol não apresentaram diferenças estatísticas entre os três métodos.

Tabela 12 - Incidência do gênero *Fusarium* em sementes de milho nos meios BDA, AST e Blotter nos lotes SNT, STI e STT. 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Abril/ 1996.

LOTES	MÉTODOS								
	BDA ¹			AST ²		BLOTTER ³			
Não Tratadas (SNT)	54,2 ⁴	A ⁵	a ⁵	31,1	B	a	10,7	C	a
Tratadas Iprodione (STI)	0,0	A	b	0,0	A	b	0,0	A	b
Tratadas Thiabendazol (STT)	0,0	A	b	0,0	A	b	1,3	A	b

¹ BDA- Batata Dextrose Ágar

² AST- Ágar Suco de Tomate

³ Blotter- Teste do Blotter ou do Papel-filtro

⁴ Percentagem média de incidência do patógeno em sementes de milho

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

A incidência do gênero *Fusarium* tem sido constatada apenas por ocasião da colheita, sendo que após secagem, durante o armazenamento estes fungos costumam ser substituídos depois de 6 meses, por outros como *Aspergillus* e *Penicillium* com capacidade de utilizar-se de substratos mais secos (CHOUDHARY e SINHA, 1993). Neste trabalho constatou-se uma redução de cerca de 25 % de *Fusarium* entre 90 e 270 DAA, nas sementes não tratadas.

No Gráfico 3, pode-se observar que o meio de BDA apresentou o maior número de sementes com o gênero *Fusarium*, quando comparado com Blotter e meio AST, o que está de acordo com NIEWEGLOWSKI (1994). Foi verificado que nas sementes com crescimento miceliano de *Fusarium*, não ocorreram outros gêneros de fungos sobre estas, com exceção a *Rhizopus*.

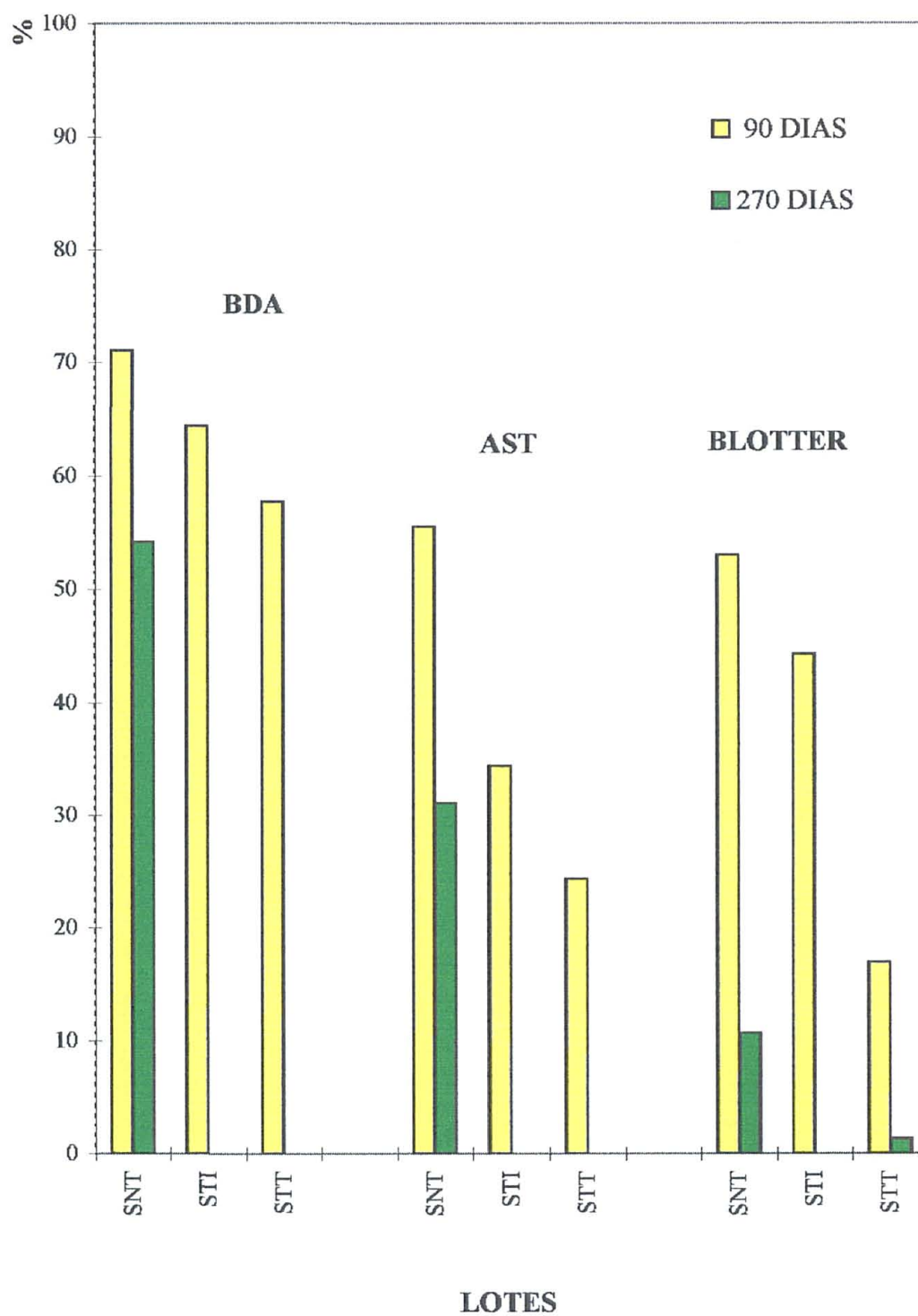


Gráfico 3 - Incidência do gênero *Fusarium* em sementes de milho nos meios de cultura BDA e AST e pelo Blotter nos lotes SNT, STI e STT. Aos 90 e 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Junho/1995 a Abril/1996.

4.5 GERMINAÇÃO DE SEMENTES

No Gráfico 4 verifica-se as percentagens de germinação de sementes, nos testes preliminares obteve-se 97,5 %.

Aos 90 DAA, verificou-se uma diferença estatística entre o lote STT e lotes SNT e STI. SILVA (1989) observou aumento no número de plântulas anormais após o tratamento de sementes com Thiabendazol o que podia ser atribuído ao efeito fungitóxico do produto aliado ao teor de umidade nas sementes a qual não está disponível nos teores em que as sementes são armazenadas.

Aos 150 dias, verificou-se sementes deterioradas que podem estar indicando o processo de deterioração que é esperado em sementes armazenadas em condições ambientais, sem controle de temperatura e umidade. Nesta avaliação o melhor resultado foi verificado no lote STT.

Aos 210 dias, os melhores resultados foram encontrados nos lotes que foram tratados com fungicidas, STI e STT, o que se pode atribuído à proteção que os fungicidas conferem às sementes.

Na avaliação da germinação de sementes foi possível observar que ocorreu uma perda de germinação das sementes ao longo do armazenamento, a qual foi acentuada depois dos 210 dias.

Aos 270 dias, verificou-se que no lote tratado com Iprodione (STI) os melhores resultados.

O lote SNT apresentou baixa germinação sendo que VON PINHO et al. (1995), obtiveram as menores percentagens médias de germinação nas

sementes não tratadas, a qual pode ser atribuída à alta incidência conjunta dos patógenos *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp.

Para as sementes tratadas com Thiabendazol, este não deve ter oferecido uma proteção efetiva e segura para as sementes armazenadas pois verificou-se aumento no total da população de fungos nas sementes e diminuição na percentagem de germinação, o que pode ser atribuído à perda de eficiência dos produtos sistêmicos pela a redução do efeito fungicida no interior dos tecidos e possível transformação em outros produtos não fungitóxicos (MENTEN, 1995). No entanto WHITE et al. (1993) verificaram o Thiabendazol prevenindo infecção por fungos de armazenamento e efetivamente protegendo a germinabilidade de sementes e o Iprodione reduzindo a taxa de deterioração de sementes.

Para MENTEN (1995), no entanto, o tratamento antecipado de sementes pode causar problemas durante armazenamento, efeito tóxico acentuado, diminuição da eficiência do produto e a utilização do produto impróprio para consumo animal ou humano.

As sementes de milho durante o período de armazenamento sofrem processo de deterioração e este processo pode ser influenciado pelo tratamento de sementes com fungicidas, sendo que o modo de ação dos fungicidas pode determinar o sucesso ou não do controle de fungos em sementes de milho.

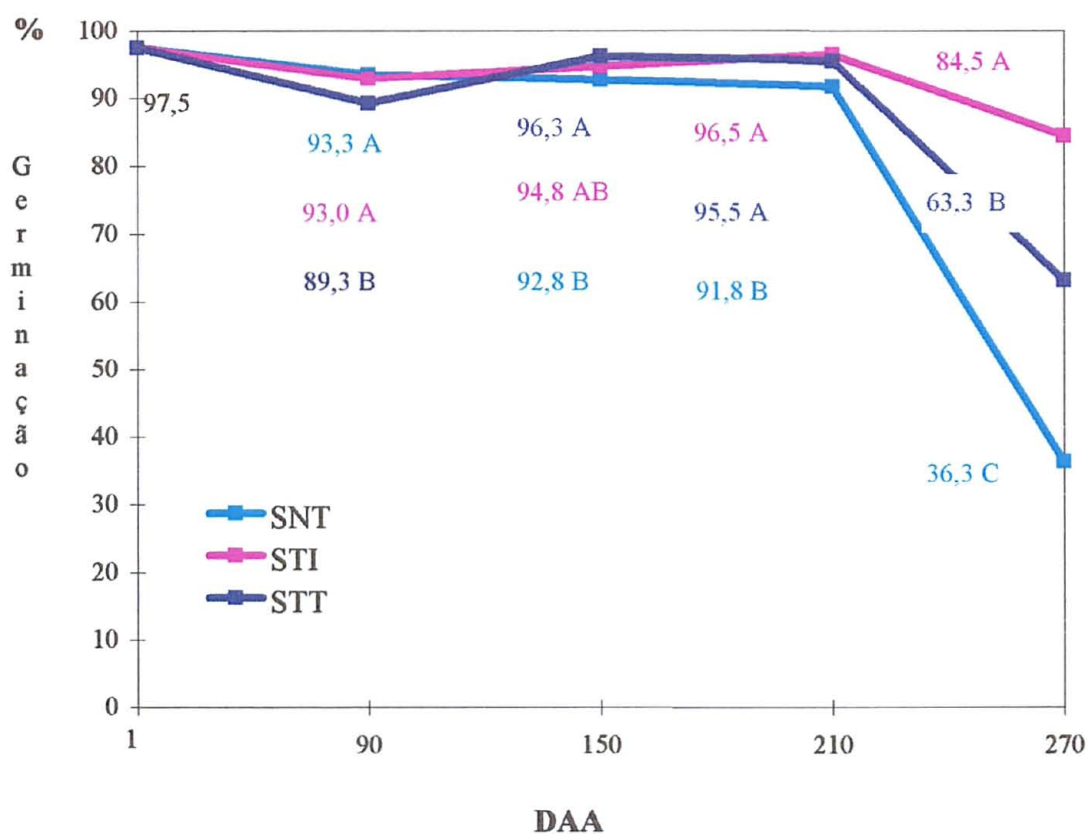


Gráfico 4 - Percentagem de germinação de sementes de milho dos lotes SNT, STI e STT. Ao 1º e aos 90, 150, 210, 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Julho/ 95 a Abril/ 96.

4.5.1 Efeito do Substrato na Germinação de Sementes em Placas de Petri e em Papel Filtro.

Foi observado que o meio AST mais 6 % de cloreto de sódio em relação ao meio BDA apresentou restrição à germinação das sementes, o que permitiu leituras por períodos mais prolongados sem que as plântulas forçassem a tampa das placas ou outras sementes, comprometendo o experimento por contaminações indesejáveis.

Pelo teste do Blotter, embora haja a germinação das sementes, o papel filtro úmido não é substrato que facilite o crescimento da maioria dos gêneros associados às sementes, havendo maior dificuldade da propagação de uma semente a outra do que nos meios de cultura (Figura 4).



Figura 4 - Efeito dos meios de cultura BDA e AST na germinação das sementes de milho. UFPR. Curitiba. PR. 1996.

4.6 TEOR DE UMIDADE DE SEMENTES

Pelo Gráfico 5, pode-se verificar que ocorreram alterações dos teores de umidade nas sementes durante o período de armazenagem.

Aos 90 dias de armazenagem a elevação do teor de umidade nas sementes pode ser atribuído à absorção de água pelas mesmas para entrar em equilíbrio com as condições ambientais, ou seja com a umidade relativa do ar, de modo serem esperadas alterações destes teores durante armazenamento (CARVALHO e NAKAGAWA, 1983),

As sementes são armazenadas com teores de umidade mais baixas com objetivo de diminuir a incidência de fungos cujos propágulos, hifas e esporos costumam estar presentes sobre e internamente à semente. No entanto, existem na natureza espécies de fungos que tem habilidade de se desenvolverem em tecidos mais secos das sementes visando o embrião e neste processo podem alterar a temperatura e umidade da semente predispondo-as ao desenvolvimento de outros fungos que se encontravam em condições desfavoráveis.

O desenvolvimento de fungos nas sementes armazenadas em condições ambientes ocorre pois mesmo a baixos teores de umidade de sementes, espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* encontram condições de proliferar-se, elevando o teor de umidade da semente e temperatura até levar a deterioração total da semente.

Estes teores mostraram que as sementes perderam ou ganharam umidade, dependendo das condições externas, as quais predisõem as

sementes à incidência de fungos e resultando em redução de poder germinativo.

Os teores de umidade de semente são importantes, pois mesmo pequenas variações podem determinar modificações substanciais qualitativas e quantitativas na microflora específica que está na semente e que é altamente dependente do conteúdo de umidade da mesma (CARVALHO e NAKAGAWA, 1983).

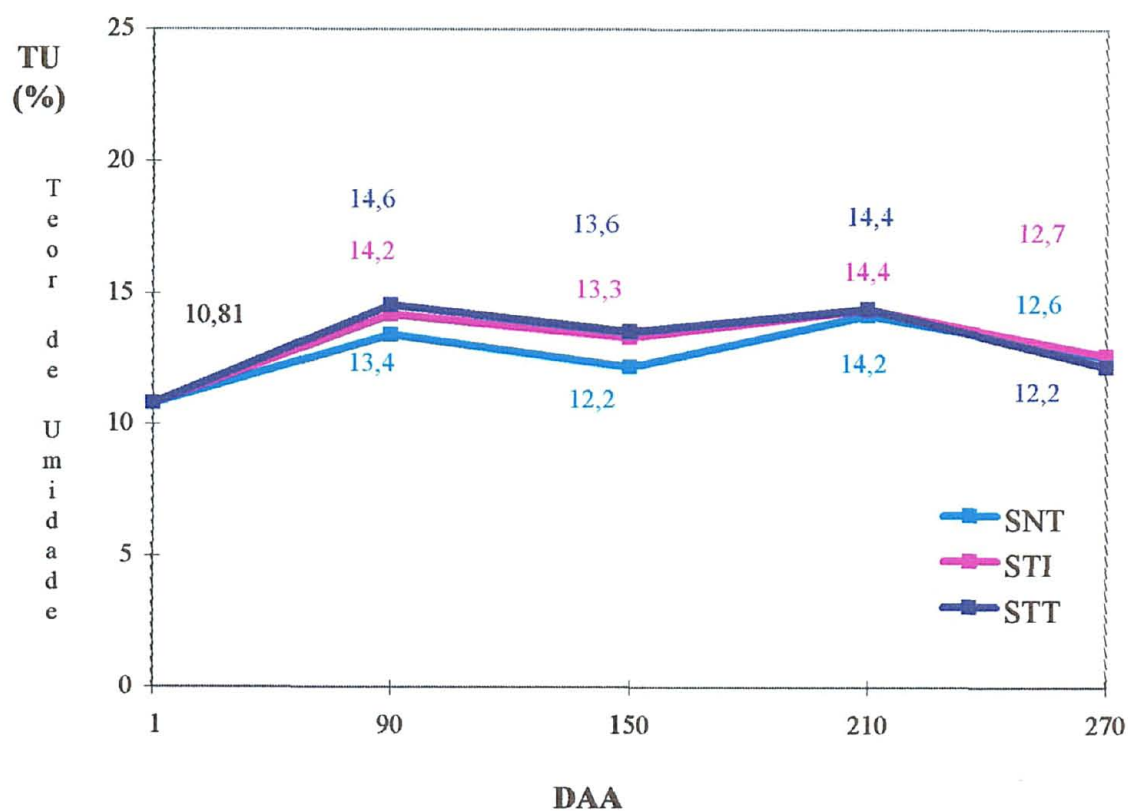


Gráfico 5 - Teor de umidade nas sementes de milho dos lotes SNT, STI e STT. Ao 1º e aos 90, 150, 210, 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Julho/ 95 a Abril/ 96.

5 CONCLUSÕES

1. Durante o armazenamento de sementes pode ocorrer um acréscimo no nível de infecção fúngica de sementes, sendo possível detectá-los com eficiência através do plaqueamento das mesmas em diferentes meios de cultura.
2. O Blotter mostrou-se de fácil utilização, mais econômico mas, menos eficiente para fungos que colonizam internamente as sementes. O teste do Blotter não é específico permitindo a detecção dos gêneros de fungos que incidem sobre as sementes.
3. Para diferentes patógenos alvo, sugere-se o uso de mais de uma metodologia para seu isolamento devido a especificidade destes.
4. A germinação de sementes pode ser afetada durante o armazenamento dependendo das condições ambientais.
5. A aplicação de fungicidas no início do armazenamento de sementes de milho, pode reduzir o crescimento fúngico evitando com isso a redução na qualidade

6 RECOMENDAÇÃO

Este trabalho relata pesquisa envolvendo agrotóxicos. Ele não contém recomendações para seu uso, nem implica que seu uso discutido aqui tenha sido registrado. Todo uso de agrotóxicos deve ser registrado nos devidos representantes estaduais e federais antes de poderem ser recomendados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANSELME, C. L. The importance of inoculum on seeds in relation to other sources. In: NASSER, L. C.; WETZEL, M. M. e FERNANDES, J. M. **Advanced International Course on Seed Pathology**. Passo Fundo. ABRATES, 1987, p. 23-37.
- 2 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 a, p. 38-50.
- 3 BERJAK, P. Seed storage problems; our research programme. In: NASSER, L. C.; WETZEL, M. M. e FERNANDES, J. M. **Advanced International Course on Seed Pathology**. Passo Fundo. ABRATES, p. 310-329, 1987 b.
- 4 BRADBURN, N. BLUNDEN, G.; COKER, R. D. and JEWERS, K. The infestation of maize with *Aspergillus* species. **Tropical Science**. London, v. 33, n. 4, p. 418-428, 1993.
- 5 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 .
- 6 CARVALHO, N. N. e NAKAGAWA, J. **Sementes, Ciência, Tecnologia e Produção**. Campinas. Fundação Cargill. 1983, 429 p.
- 7 CDA - **Compêndio de Defensivos Agrícolas**- Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. Ed. Andrei. 1990, 470p.
- 8 CHOUDHARY, A. K. and SINHA, K. K. Competition between a toxigenic *Aspergillus flavus* strain and other fungi on stored maize

- kernels. **J. Stored Prod. Res.**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 75-80, 1993.
- 9 CHRISTENSEN, C.M. and KAUFMANN, H. H. **Grain storage: The Role of Fungi in Quality Loss**. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1969.
 - 10 CHRISTENSEN, C.M. Microflora and seed deterioration. In: ROBERTS, E. H., **Viability of Seeds**. USA. Syracuse Univ. Press. p. 59-93. 1972.
 - 11 COSTA, J. L. S.; KUSHALAPPA, A. C. Reação do milho à *Aspergillus flavus* e subsequente produção de aflatoxina. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 15, n.2, p. 156-162, ab/jun. 1989.
 - 12 COTTY, P. J. Comparison of four media for isolations of *Aspergillus flavus* group fungi. **Mycopath.**, Netherlands, v. 125, p.157-162, 1994.
 - 13 DEACON, J. W. **Introduction to modern mycology**: Basic Microbiology. 2. ed. Blackwell Scientific Publications, v. 7, 1984, 239 p.
 - 14 DHINGRA, O. D.; MUCHOVEY, J. J. ; CRUZ FILHO, J. **Tratamento de Sementes-Controle de Patógenos**. Viçosa: Imprensa Universitária, MG, 1980. 121 p.
 - 15 DHINGRA, O. D. Prejuízos causados por microrganismos durante armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7 , n. 1, p. 139-145, 1985.
 - 16 GOULART, A. C. P. Qualidade sanitária de milho "BR-201" produzidas produzidas na região de Dourados, MS, no ano de 1993. **Informativo ABRATES**, v. 4, n. 3, p. 53-55, dez. 1994.
 - 17 GRIFFIN, J. G., FORD, R. H.; GARREN, K. H. Relation of *Aspergillus flavus* colony growth on three selective media to recovery from naturally infested soil. **Phytopath.**, St. Paul, v. 65, p. 704-707, 1975.
 - 18 GRIFFIN, H. D. **Fungal Physiology**. 2. ed. John Willey & Sons, 1994, 458 p.
 - 19 HASAN, H. A. H. Fungicide inhibition of Aflatoxins, Diacetoxyscirpenol and Zearalenone Production. **Folia Microbiologica**, Tchechoslovakia, v. 38, n.4, p. 295-298, 1993.
 - 20 HENNING, A. A. Patologia de Sementes, **Comunicado Técnico. Centro de Pesquisa de Soja**, Londrina, n.90, p. 1-43, 1997.
 - 21 INGOLD, C. T. **Biology of fungi**. 5. ed., London: Chapman & Hall, 1992. 150 p.

- 22 ITO, M. F.; BACCHI, L. M. A. MARINGONI, A. C. e MENTEN, J. O. M. Comparação de métodos de detecção de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp em sementes de amendoim (*Arachis hypogea*). **Summa Phytopathologica**. Piracicaba, v.18, p. 262-268, 1992.
- 23 KENNEDY, B. W. The occurrence of *Aspergillus* spp on stored seeds. In: **Seed Pathology**. IAPAR, 1979. p. 257-261.
- 24 KEROMNES, J.; PELHATE, J. Alteration de la germination des semences de maïs par *Penicillium cyclopium*, *Penicillium janthinellum* et *Penicillium stoloniferum* mise en évidence de leur phytotoxicité. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 16, p. 663-71, 1988.
- 25 KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Agentes causais. Fungos. In: **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). Agr. Ceres, v. 1, p. 67-74, 1995.
- 26 LASCA, C. C. Tratamento de sementes. **Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes**, Anais, Campinas, 1986. p. 93-99.
- 27 LASCA, C. C. Padrões de sanidade e tolerância de infecção de sementes por patógenos de importância econômica. In: **CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**. Botucatu. 1997. p. 53-55.
- 28 LAZZARI, F. A. **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações**. Paranaset. Curitiba, 140 p. 1993.
- 29 LUCCA FILHO, O. A. Teste de Sanidade de Sementes de Milho. In: **Patologia de Sementes**. Fundação Cargill, Campinas. 1987. p. 430-439.
- 30 LUZ, W. C. Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil. Circular Técnica. **Centro Nacional de Pesquisa do Trigo**, Passo Fundo, n.5, p. 1-2, 1995.
- 31 LUZ, W. C.; PEREIRA, L. R. Tratamento químico de sementes de milho: amplitude de ação e efeito no rendimento. In: **Reunião Técnica do Sorgo**. (24:1996:Londrina). Anais. 1996. 2p.
- 32 LUZ, W. C. Tratamento de sementes de milho com fungicida. Circular Técnica. **Centro Nacional de Pesquisa do Trigo**, Passo Fundo, n. 7, 1996 b, 24 p.
- 33 MARTINEZ, E. M e MANDUGANO, L. Use of fungicides for corn seed viability preservation. **Seed and Science & Technology**. Zurich, v. 13, p. 235-241, 1985a.
- 34 MARTINEZ, E. M.; BADILLO, M. E. B.; NAVARRETE, R. e GONZALEZ,

- J. R. Effect of fungi and chemical treatment on viability of maize and barley seeds with different storage characteristics. **Seed and Science & Technology**, Zurich, v. 22, p. 541-549, 1994.
- 35 MAUDE, R.B. Seedborne diseases and their control - Principles and practices. **CAB International**, 1996. 280 p.
- 36 McDONALD, M. B. , SULLIVAN, J. and LAUER, M. J. The pathway of water uptake in maize seeds. **Seed Science & Technology**. Zurich, v. 22, p.79-90, 1994.
- 37 McLEAN, M.; BERJAK, P. Cold storage of high and low moisture content, in infected maize seed. In: **ELECTRON MICROSCOPY SOCIETY OF SOUTHERN AFRICA** - Proceedings. Durban, v. 15, p.101-102. 1985
- 38 MENTEN, J. O. M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: **Patógenos em Sementes: Detecção, danos e controle químico**. São Paulo, Ciba Agro, 1995. p. 115-136.
- 39 MILLS, J. T. Insects-fungus associations influencing seed deterioration. **Phytopathology**. St. Paul. v. 73, n. 2 , p. 330-335, 1983.
- 40 MORENO, E, BENAVIDES, C.; RAMIREZ, J. The influence of hermetic storage on the behaviour of maize seed germination. **Seed Science & Technology**. Zurich, v. 16, p. 427- 434, 1988.
- 41 MYCOCK, D. J.; LLOYD, H.L.; BERJAK, P. Micropylar infection of post-harvest caryopses of *Zea mays* by *Aspergillus flavus* var. *colummaris* var. nov. **Seed Science & Technology**. Zurich, v.16, p.647-653.1988.
- 42 MYCOCK, O. J.; BERJAK, P. Paradoxical behavior of seed-storage and field fungi; an overview. **South African Journal of Science**. v. 88, n. 7, p. 371-375, 1992.
- 43 NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: MacMillan, 1979, 839 p.
- 44 NIEWEGLOWSKI, M. F. **A influência de fatores bióticos e abióticos na degradação do malathion e deltamethrina em grãos de milho armazenado**. Curitiba, 1994. Dissertação. Universidade Federal do Paraná.
- 45 ONO, E. Y. S et al. Microbiota fúngica em amostras de milho da Região Sul do Paraná. In: **Congresso de Milho e Sorgo**. Londrina. 1996.
- 46 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. 216-219, 1994.

- 47 PICININI, E. C. Fungicidas Benzimidazoles. Revisão Anual de Patógenos de Plantas. **EMBRAPA-CNPT**, Passo Fundo, 1994. v. 2, p. 357-409.
- 48 PINTO, N. F. J. A. P. Controle de patógenos em grãos de milho armazenados. In : **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Botucatu. 1997. p. 42-43.
- 49 POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília. 1985. 289 p.
- 50 REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de Identificação e Controle de Doenças de Milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte. 1996, 80p.
- 51 SAUER, D. B.; BURROUGHS, R. Desinfection of seed surfaces with hypochlorite. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 7, p. 745-749, 1986.
- 52 VECCHIATO, M. H.; KOHARA, E. Y. ; MENTEN, J. O. M. Efeito do armazenamento em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**. v. 1, n. 2, p. 204-208, jun. 1994.
- 53 VITTI, A.J.; CARVALHO, M. L. ; MENTEN, J. O. M. Efeito do tratamento químico de sementes no desempenho de sementes de soja. **Ecosistema**. v. 18, p. 75-83, 1993.
- 54 VON PINHO, E. V. R. CAVARIANI, C.; ALEXANDRE et al. 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.
- 55 WETZEL, M. M. V. S. Fungos de Armazenamento. In: **Patologia de Sementes**. J. SOAVE e WETZEL, M. M. V. S. Campinas. Fundação Cargill. p. 260-75, 1987.
- 56 WHITE, D. G; TOMAN, J.; BURNETTE, D. C. The effect of postharvest fungicide application on storage fungi of corn during ambient air drying and storage. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 6, p. 562 - 8. jun. 1993.
- 57 WHITE JUNIOR, J.; WHITE, D. G. Efficacy of iprodione for control of storage fungi in corn. **Plant Disease**, St. Paul. v. 78, n. 1, p. 27- 33, jan. 1994.
- 58 WINCKLOW, D.T. et al. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in controlled environment. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 1, 1988, p. 68-74.
- 59 ZAMBOLIM, L. et al. Curso de Proteção de Plantas-Controle Integrado de Doenças de Plantas. **ABEAS**, Viçosa, 1995, 134p.

8 ANEXOS

Anexo 1 - Incidência do gênero *Penicillium* em sementes de milho nos meios de BDA e AST e pelo Blotter, nos lotes SNT, STI e STT. Análise de variância aos 90, 150, 210 e 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Junho/1995 a Abril/ 1996.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios			
		90 Dias	150 Dias	210 Dias	270 Dias
Métodos	2	1,83 **	0,78 *	2,81 **	0,50 ^{ns}
Tratamentos	2	16,90 **	32,54 **	2,66 **	52,03 **
Métodos x Tratamentos	4	1,07 *	0,13 **	3,53 **	7,82 **
Erro	18	0,28	0,20	0,37	0,28
Coeficiente de Variação (%)		22,71	20,42	23,62	13,32
χ^2		4,40 ^{ns}	3,90 ^{ns}	3,60 ^{ns}	2,90 ^{ns}

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

χ^2 = Teste de Bartlett

Anexo 2 - Incidência do gênero *Aspergillus* em sementes de milho nos meios de BDA e AST e pelo Blotter, nos lotes SNT, STI e STT. Análise de variância aos 90, 150, 210 e 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Junho/1995 a Abril/ 1996.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	
		210 Dias	270 Dias
Métodos	2	14,59 **	29,60 **
Tratamentos	2	9,72 **	58,88 **
Métodos x Tratamentos	4	7,49 **	6,90 **
Erro	18	0,35	0,23
Coeficiente de Variação (%)		23,31	8,62
χ^2		8,81 ^{ns}	9,00 ^{ns}

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

χ^2 = Teste de Bartlett

Anexo 3 - Incidência do gênero *Fusarium* em sementes de milho nos meios de BDA e AST e pelo Blotter, nos lotes SNT, STI e STT. Análise de variância aos 90 e 270 DAA. UFPR. Curitiba. PR. Junho/1995 a Abril/ 1996.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	
		90 dias	270 dias
Métodos	2	10,54 **	3,18 **
Tratamentos	2	11,44 **	59,58 **
Métodos x Tratamentos	4	1,48 **	4,55 **
Erro	18	0,14	0,28
Coeficiente de Variação (%)		5,59	20,87
χ^2		5,80 ^{ns}	9,10 ^{ns}

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

χ^2 = Teste de Bartlett