**ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL: COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO
DAS SEMENTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E SUAS
RELAÇÕES COM A PRESENÇA DE MICRORGANISMOS**

MONALISA ALVES DINIZ DA SILVA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. WALTER RODRIGUES DA SILVA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Fitotecnia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Silva, Monalisa Alves Diniz da

Envelhecimento artificial: comportamento fisiológico das sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e suas relações com a presença de microrganismos / Monalisa Alves Diniz da Silva. - - Piracicaba, 1997.

61 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.

Bibliografia.

1. Envelhecimento (artificial) 2. Feijão 3. Patógeno 4. Semente I. Título.

CDD 635.652

**ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL: COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO
DAS SEMENTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E SUAS
RELAÇÕES COM A PRESENÇA DE MICRORGANISMOS**

MONALISA ALVES DINIZ DA SILVA

Aprovada em: 26.03.97.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. WALTER RODRIGUES DA SILVA

ESALQ/USP

Prof. Dr. SILVIO MOURE CICERO

ESALQ/USP

Prof. Dr. JACIRO SOAVE

IAC

Prof. Dr. WALTER RODRIGUES DA SILVA
Orientador

Aos meus pais Antonio e Neusa,
pelo amor e apoio que me
dedicam sempre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Walter Rodrigues da Silva pela orientação e apoio.

Aos Professores Francisco Ferraz de Toledo, Júlio Marcos Filho, Sílvio Moure Cícero e José Otávio M. Menten pela oportunidade de convívio.

Aos Engenheiros Agrônomos Maria Heloísa D. Moraes, Helena Maria P. Chamma, Ana Dionísia L. C. Novembre e Cláudio Cavariani pela amizade e apoio durante o transcorrer do curso.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura Ilze Helena G. das Neves, Hodair Banzatto Junior, João Batista Bigelli, João Elias Jabur Filho e Maria Aparecida Soledade pelos serviços prestados.

Às laboratoristas Raquel F. Castelani e Evelyn F. A. Koch pelo auxílio no trabalho desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia Sabino e Katia Maria de Andrade Ferraz pela colaboração prestada.

Aos colegas de pós-graduação pela amizade e carinho, em especial à Maria Cristina M. Spínola, Cibeles Chalita, Vera Quecini, Denise A. C. Bília, Édila V. R. V. Pinho, Raymundo V. Nuño, Ceci C. Custódio, Marco A. Souza, Antonio D. Alexandre, Denise C. F. S. Dias, Maria Laene M. Carvalho e Luiz C. Miranda.

Às amigas Conceição S. Carvalho, Sílvia Cenci e Giovanna R. Chagas pela compreensão e paciência durante o transcorrer da permanência em Piracicaba.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Fungos de campo	04
2.2. Fungos de armazenamento	06
2.3. Aspectos fisiológicos e sanitários envolvidos na estimativa do vigor das sementes	09
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Obtenção dos pré-tratamentos e dos tratamentos	14
3.2. Determinações	16
a) Pureza física	16
b) Sanidade	16
c) Grau de umidade	16
d) Germinação	17
e) Tetrazólio	17
f) Envelhecimento artificial	17
g) Comprimento da plântula	18
h) Peso da matéria seca da plântula	18
i) Emergência das plântulas	18
j) Condutividade elétrica	18
l) Lixiviação de potássio	19
3.3. Delineamento experimental e procedimento estatístico.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Caracterização do lote original	21
4.2. Análise sanitária	21
4.3. Teor de água das sementes	25

4.4. Germinação	26
4.5. Viabilidade (tetrazólio)	32
4.6. Comprimento e peso da matéria seca da plântula	34
4.7. Emergência das plantulas	37
4.8. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio	40
4.9. Considerações gerais	43
5. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL: COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DAS SEMENTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E SUAS RELAÇÕES COM A PRESENÇA DE MICRORGANISMOS

Autor: Monalisa Alves Diniz da Silva

Orientador: Prof. Dr. Walter Rodrigues da Silva

RESUMO

O teste de envelhecimento artificial, apesar de recomendado para avaliar o vigor de lotes de sementes, apresenta variabilidade, por motivos não devidamente elucidados, em seus resultados. A ação dos fungos associados às sementes é considerada uma das causas responsáveis por essa variação.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos das condições ambientais, do envelhecimento artificial, nos comportamentos das sementes do feijoeiro e dos fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*, inoculados artificialmente pelo método de contato.

Para tanto, com a condução de quatro experimentos, foram estudadas etapas metodológicas para a inoculação dos fungos e períodos de envelhecimento artificial. Foram conduzidos, para a avaliação do comportamento das sementes, os testes de sanidade, grau de umidade, germinação, tetrazólio, comprimento e peso da matéria seca da plântula, emergência, condutividade elétrica e lixiviação de potássio.

As respostas obtidas, além de dependerem da duração do período de envelhecimento, indicaram efeitos do nível do inóculo e da espécie fúngica que contaminava a semente.

Concluiu-se que o teste de envelhecimento artificial associa a expressão de causas fisiológicas e sanitárias que, por sua vez, devem ter os

efeitos separados para a devida interpretação dos dados obtidos; as presenças de patógenos, particularmente de *Aspergillus* spp., podem ser consideradas como capazes de interferir, de modo substancial e negativo, no desempenho das sementes envelhecidas artificialmente.

**ARTIFICIAL AGING: PHYSIOLOGICAL BEHAVIOR OF BEAN
(*Phaseolus vulgaris* L.) SEEDS AND THEIR RELATIONSHIP WITH
MICROORGANISMS**

Author: Monalisa Alves Diniz da Silva

Adviser: Prof. Dr. Walter Rodrigues da Silva

SUMMARY

Although recommended for evaluation of seed lot vigor, the results with the artificial aging test show variability for reasons yet to be elucidated. The association of seed fungi is considered one of the causes responsible for such variation.

In that context, the goal of this work was to verify the effects of environmental conditions and artificial aging on bean seed behavior and those of *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum*, and *Colletotrichum lindemuthianum* fungi artificially inoculated by the contact method.

Four experiments were conducted in order to study methodological stages for fungi inoculation and artificial aging periods. Health, moisture degree, germination, tetrazolium, length and weight of seedling dry matter, emergence, electrical conductivity, and potassium leaching tests were performed for the seed behavior evaluation.

The answers achieved, besides dependable on the aging period time, indicated the effects of the inoculum level and fungus species present in the seed.

The artificial aging test was found to associate the expression of physiological and sanitary causes that, in their turn, are to be separated for suitable data interpretation; the presence of pathogens, particularly *Aspergillus*

spp., may be considered as capable of interfering in the behavior of artificially aged seeds in a considerable and negative way.

1. INTRODUÇÃO

A informação sobre qualidade fisiológica, utilizada para a comercialização de lotes de sementes, é proveniente do teste padrão de germinação que, entretanto, não se tem mostrado satisfatório para estimar o potencial de armazenamento e o comportamento das sementes em condições de campo.

Assim, a necessidade de informações a respeito do vigor de lotes de sementes, em programas de controle de qualidade, tem motivado a procura de metodologias capazes de detectar, com maior precisão, a qualidade fisiológica.

A técnica de envelhecimento artificial, de fácil execução, tem se mostrado eficiente para avaliar o vigor dos lotes de sementes. Ao mesmo tempo em que identifica pequenas diferenças de vigor, pode estimar o potencial de conservação. Contudo, embora a qualidade das sementes seja tida como um dos fatores relacionados ao estabelecimento das culturas, os aspectos patológicos têm sido pouco considerados, apesar da reconhecida participação dos microrganismos nos prejuízos do desempenho das sementes.

A maioria das principais doenças do feijoeiro tem seus agentes associados às sementes, incluindo bactérias, vírus e fungos; estes últimos são mais comumente observados, provavelmente, pelos maiores conhecimento e exequibilidade dos métodos de detecção.

Os testes destinados à avaliação da qualidade fisiológica das sementes, contrariamente ao previsto em suas concepções fundamentais, fornecem dados de desempenho que expressam a atuação aditiva de causas fisiológicas e sanitárias. Contudo, na maioria das vezes, o método empregado

não isola a interferência dos microrganismos que, como agentes efetivos durante a execução dos testes, influem diretamente nos resultados obtidos. O teste de envelhecimento artificial se constitui em um exemplo desse caso.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar os comportamentos, isolado e conjunto, dos patógenos e das sementes durante o teste de envelhecimento artificial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Na cultura do feijoeiro, uma das causas do reduzido rendimento é a ocorrência de doenças (Galli et al., 1968; Costa, 1972; Sanders & Schwartz, 1980; Bulisani et al., 1987) que, na maior parte dos casos, tem agentes causais transmitidos pelas sementes (Noble & Richardson, 1968; Lasca, 1976; Ellis & Gálvez, 1980; Menezes, 1985). Dentre estes, destacam-se os dos gêneros *Colletotrichum*, *Isariopsis*, *Macrophomina*, *Fusarium*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, além de alguns vírus (Rava et al., 1981).

Em diversas culturas, a qualidade fisiológica das sementes pode ser afetada pela presença de agentes causadores de doenças nas sementes que, por sua vez, podem promover a disseminação do problema em novas áreas semeadas (Neergaard, 1979; Dhingra et al., 1980; Filgueiras, 1981; Lucca Filho, 1985). Dependendo das condições ambientais, o inóculo primário pode causar epifitias ao se dispersar pelas plantas do campo e persistir, em restos de cultura, por longo período (Vieira & Sartorato, 1984).

Conforme a forma de disseminação do patógeno, surgem dificuldades para a determinação do número de sementes contaminadas durante as análises de rotina executadas nas sementes; os patógenos podem não produzir sintomas externos que permitam sua caracterização através de exame não específico.

Há microrganismos patogênicos que podem reduzir a qualidade das sementes. Os sintomas encontrados, em geral, se constituem de esclerotização ou estromatização, podridão, redução do tamanho e aborto, necrose, mancha, redução da germinação e outras alterações fisiológicas na semente (Neergaard, 1979; Lucca Filho, 1985).

Estudos, comparando o desempenho das sementes de feijão em função da qualidade sanitária, apresentaram resultados indicativos de que aumentos no rendimento, de 8 a 95%, podem ser conseguidos através da utilização de sementes sadias (Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR & Associação de Crédito e Assistência Rural do Paraná-ACARPA, 1979; Alberini & Lollato, 1980).

2.1. Fungos de Campo

São denominados fungos de campo aqueles que, associados às sementes entre a formação e a pré-colheita, tendem à latência ou morte durante o armazenamento, fundamentalmente, por limitações na disponibilidade hídrica.

A análise de sanidade, através da identificação dos microrganismos transportados pelas sementes, pode servir como referencial para a definição de tratamento destinado a atenuar a ação negativa dos patógenos sobre a qualidade fisiológica do lote (Schwartz, 1980; Richardson, 1981; Pereira, 1984; Tanaka & Machado, 1985). Contudo, deve ser considerado que, nem sempre, o patógeno altera o desempenho da semente; como exemplo pode ser citada a baixa interferência do *Colletotrichum lindemuthianum* na taxa de germinação das sementes de feijão (Patrício et al., 1991).

As sementes de feijão, atacadas pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, apresentam lesões deprimidas com tamanhos variáveis e coloração entre parda e negra, dependendo da cor do tegumento atacado; o patógeno pode atravessar o tegumento e atingir os cotilédones (Costa, 1972; Kimati, 1980; Vieira, 1983). As condições ótimas para o seu desenvolvimento são alta umidade e temperatura entre 18 e 22°C (Zambolim & Chaves, 1978). O micélio pode estar localizado no tegumento ou no embrião (Anselme & Champion, 1981). Sementes de feijão, contaminadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, originam plântulas com cotilédones, hipocótilo e folhas

primárias doentes; com a esporulação do fungo, há a produção de inóculo para uma infecção secundária (Machado, 1988).

Plântulas, com sintomas de antracnose, foram obtidas a partir da inoculação artificial de sementes de feijão com *Colletotrichum lindemuthianum*, através de métodos de imersão, em suspensão de conídios, e de contato, com a superfície da colônia em meio agarizado (Oliveira, 1991).

Sintomas de infecção em sementes de plântulas de feijão, causados pelos fungos *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria* spp., podem ser identificados nos testes rotineiros de germinação. O fungo *Rhizoctonia solani* pode ser encontrado interna ou externamente nas sementes (Bolkan et al., 1974; Bolkan et al., 1976). O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* foi isolado, em plântulas com sintomas, no teste de germinação conduzido sob 20°C (Patricio et al., 1991); este patógeno pode estar presente, externamente às sementes, na forma de esclerócio ou, internamente, na forma de micélio dormente (Lucca Filho, 1985).

Dhingra (1978) relatou a importância de *Phomopsis* sp. como redutor da qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro. Ellis et al. (1976) observaram *Phomopsis* sp. prejudicando a qualidade fisiológica de sementes com 12% de infecção e, paralelamente, *Fusarium semitectum*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* anulando a germinação.

O fungo *Fusarium oxysporum*, habitante do solo, pode ser disseminado por sementes; o seu desenvolvimento, favorecido por temperaturas em torno de 20°C e alta umidade (Bolkan, 1980), permite a colonização do sistema vascular da planta com decorrentes perda de turgescência e amarelecimento das folhas (Dongo & Muller, 1969).

Os fungos *Curvularia lunata*, *Diplodia maydis* e *Fusarium moniliforme* foram isolados, em sorgo, de plântulas anormais e de sementes mortas, sugerindo a existência de relações entre as suas presenças e os prejuízos no desempenho das sementes (Wu & Cheng, 1990).

2.2. Fungos de armazenamento

Quando as sementes são armazenadas, pode ocorrer invasão por um grupo de microrganismos denominados “fungos de armazenamento”. *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. são os mais comumente encontrados em sementes de feijão (Tervet, 1945; Bolkan et al., 1976).

A ação dos fungos de armazenamento, na qualidade das sementes, pode promover enfraquecimento ou morte do embrião, bolor, apodrecimento e combustão (Dhingra, 1985). Os fatores mais importantes, no estabelecimento dos fungos de armazenamento nas sementes, são o teor de água das sementes, a umidade relativa do ar, a temperatura e o período de conservação. Estes fungos são os principais responsáveis pela perda de viabilidade das sementes armazenadas com teor de água superior a um valor crítico, particular para cada espécie fúngica envolvida. A maioria destes fungos ataca, principalmente, o embrião.

A presença de fungos em sementes, com 17 a 19% de água e mantidas entre 15 a 30°C, pode causar rápida perda de viabilidade (Agarwal & Sinclair, 1987). Maiores riscos de contaminação, por fungos de armazenamento, ocorrem quando a umidade das sementes encontra-se acima de 13,5% (Christensen & Kaufmann, 1974).

Os fungos que atacam as sementes armazenadas têm características xerofíticas, podendo se desenvolver sob umidades relativas do ar próximas a 70%; os intervalos de 0 a 5°C e de 28 a 35°C são tidos, respectivamente, como mínimo e ótimo para o desenvolvimento da maioria desses fungos (Dhingra, 1985).

O grau de infecção, anterior ao armazenamento, pode determinar a perda de viabilidade das sementes. Como os fungos já se encontram associados às sementes, a sua ação patológica poderá ocorrer, mesmo em condições ambientais desfavoráveis à sua disseminação para as sementes sadias.

Sementes de algodão, inoculadas com *Rhizopus arrhizus*, mostraram decréscimo imediato no vigor, aparentemente, associado com a necrose ocorrida durante a germinação (Halloin, 1975). Sintomas de podridão dos cotilédones e do hipocótilo, de plântulas de algodão, foram causados por *Rhizopus* spp. que, paralelamente, impediu a detecção de outros fungos em virtude de seu crescimento agressivo (Lima et al., 1982).

Com o aumento do período de armazenagem das sementes de soja, Kabeere & Taligoola (1983) observaram acréscimo na taxa de sementes mortas, cobertas com *Rhizopus* spp. e bactérias, indicando associação entre a presença de microrganismos e a perda da viabilidade das sementes.

Problemas, nas germinações de soja e de amendoim, foram identificados, respectivamente por Henning et al. (1985) e Phipps (1984), como causados por *Rhizopus* spp., considerado saprófita. Adicionalmente, Lima et al. (1982) e Kabeere & Taligoola (1983) observaram que o microrganismo, freqüentemente, ocorre em sementes prejudicando a germinação, o vigor e causando tombamento nas plântulas; assim, apesar das dúvidas quanto à sua patogenicidade, o fungo tem afetado, negativamente, o desempenho fisiológico das sementes.

Sementes de ervilha, inoculadas com os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus restrictus* e *Aspergillus amstelodami*, tiveram decréscimo na germinação; as sementes não inoculadas e armazenadas sob as mesmas condições ambientais (temperaturas de 10-30°C e umidades relativas do ar de 75-92%), permaneceram livres de *Aspergillus* spp. e seu poder germinativo não declinou (Fields & King, 1962), sugerindo que a redução encontrada na germinação do material inoculado tenha sido devida à ação patogênica dos fungos.

A inoculação de sementes de soja com *Aspergillus* spp., provocou decréscimo na germinação (Dhingra et al., 1973; Ellis et al., 1974) e tombamento (Saharan & Gupta, 1973). Os esporos de *Aspergillus flavus*, pulverizados sobre as sementes de soja, causaram retardamento do

desenvolvimento das plântulas; os de *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus*, por outro lado, não afetaram o desempenho (Tervet, 1945).

Decréscimos nas porcentagens de germinação e de emergência foram verificados em sementes de feijão inoculadas com *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. previamente ao armazenamento (Tanaka & Corrêa, 1981).

Sementes de milho, inoculadas ou não com *Aspergillus flavus*, foram armazenadas com 19% de água a 20-25°C; após 74 dias, as sementes inoculadas apresentaram 14% de germinação enquanto, as não inoculadas, mantiveram germinação de 97% (Lópes & Christensen, 1967), evidenciando a associação entre redução na germinação e a presença do fungo.

Lima et al. (1984) verificaram, em sementes de algodão, que a inoculação de *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, prejudicou a germinação e o vigor.

A utilização de filtrados dos grupos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Alternaria alternata*, em sementes de caupi, afetaram, adversamente, as elongações, da plúmula e da raiz, e o peso da matéria seca das plântulas (Hegde & Hiremath, 1987). A imersão de sementes de feijão, por 20 horas em filtrado de *Aspergillus flavus*, promoveu mortalidade em 100% das plântulas (Sharma & Gupta, 1980).

De um modo geral, a ação bioquímica dos microrganismos, sobre o hospedeiro, está relacionada com a ação de enzimas na degradação da parede celular, com anormalidades decorrentes de alterações na produção de hormônios de crescimento e com a produção de toxinas que, paralelamente, podem causar decomposição nos tecidos vivos, redução do crescimento radicular, aumento da taxa respiratória e interferência no metabolismo normal do hospedeiro (Lucca Filho, 1985).

Anderson et al. (1970) sugeriram que uma toxina fúngica poderia promover dano à membrana celular e participar da deterioração em sementes de trigo infectadas.

A deterioração de sementes de ervilha, contaminadas por *Aspergillus ruber*, foi induzida por micotoxina capaz de matar o embrião antes da infecção pelo fungo (Harman & Nash, 1972). As toxinas fúngicas difusíveis e as enzimas autocatalíticas do hospedeiro podem, também, estar envolvidas na deterioração de sementes de algodão contaminadas com espécies de *Aspergillus* (Halloin, 1975).

A presença de fungos acelerou o processo de deterioração das sementes de cenoura, rabanete e tomate armazenadas em condições de temperatura e umidade relativa do ar elevadas (Kononkov & Dudina, 1986). Os mesmos pesquisadores consideraram que algumas sementes foram mortas pelos metabólitos provenientes dos fungos de armazenamento estabelecidos, extensivamente, na superfície das sementes.

A invasão dos fungos de armazenamento, nas camadas internas do tegumento das sementes, conduz ao enfraquecimento do embrião, e eventual morte, devido à produção de toxinas pelos fungos (McDonald et al., 1993).

2.3. Aspectos fisiológicos e sanitários envolvidos na estimativa do vigor das sementes

As sementes, após atingirem a máxima qualidade no ponto de maturidade fisiológica, passam a apresentar declínio de desempenho associado à idade (Byrd & Delouche, 1971; Woodstock, 1973; McDonald Jr., 1975). A velocidade de envelhecimento depende de vários fatores endógenos e exógenos como, por exemplo, o genótipo, o teor de água e o ambiente de armazenamento, especialmente com relação à temperatura e à umidade relativa do ar (Delouche & Baskin, 1973; Mondragon & Potts, 1974; Potts et al., 1978; TeKrony et al., 1980).

Anteriormente à morte decorrente do envelhecimento, há estádios de deterioração representados por danificação cromossômica (Roberts, 1973), perda de enzimas (Woodstock, 1973), degradação do sistema respiratório

(Abdul-Baki & Anderson, 1972), diminuição na produção de ATP (Anderson, 1977; Ching, 1973) e deterioração das membranas celulares (Berjak & Villiers, 1972 a; Roberts, 1972; Abdul-Baki & Baker, 1973; Simon, 1974; Matthews, 1985; Bewley, 1986; Ganguli & Sen-Mandi, 1990; Lin, 1990 e Basavarajappa et al., 1991).

De acordo com Matthews (1985), a primeira manifestação fisiológica do processo de envelhecimento é o declínio da velocidade de germinação que, por sua vez, corresponde ao primeiro indício de desestruturação das membranas celulares. Posteriormente, ocorre a redução do tamanho das plântulas e o aumento da incidência de plântulas anormais, decorrente da morte de tecidos importantes em diferentes regiões da semente.

O vigor das sementes pode ser entendido como reflexo de um conjunto, de características ou propriedades, que determinaria o desempenho em diferentes condições de ambiente; têm sido desenvolvidos vários métodos, para a sua avaliação, em virtude das demandas provenientes dos programas de controle de qualidade de sementes (Marcos Filho, 1994).

O teste de envelhecimento artificial foi considerado, por Delouche & Baskin (1973), capaz de produzir informações consistentes, em várias espécies, através de técnica facilmente utilizável. A sua condução, sob condições de elevadas temperatura e umidade relativa do ar, ocasiona a deterioração das sementes e favorece o aparecimento, na germinação subsequente, de anormalidades ou morte (McDonald et al., 1993).

Medina et al. (1993) submeteram sementes de soja, ao teste de envelhecimento artificial, para estudar as alterações fisiológicas provocadas; verificaram, através dos testes de tetrazólio e de condutividade elétrica, que as condições de temperatura de 42°C e de umidade relativa do ar próxima de 100%, durante 48 horas, promoveram deterioração do sistema de membranas celulares e lesões nos cotilédones e no eixo embrionário. Diminuições no crescimento e na porcentagem de emergência de plântulas, em trigo e ervilha,

foram observadas com o aumento da duração dos tratamentos de envelhecimento artificial (Purkar et al., 1980).

As perdas na germinação e no vigor, medidas através do teste de tetrazólio em sementes de feijão, soja e amendoim envelhecidas artificialmente, correlacionou-se com o aumento da lixiviação eletrolítica (Parrish & Leopold, 1978; Pearce & Abdel Samad, 1980). Este aumento, da lixiviação de solutos nas sementes envelhecidas, tem sido relatado como sendo decorrência da deterioração das membranas celulares (Ching & Schoolcraft, 1968 e Ching, 1972). Mullet & Considine (1980), trabalhando com ervilha e feijão, observaram que a concentração de K^+ foi alterada com a duração dos períodos de embebição e de envelhecimento das sementes. Quando o período de envelhecimento aumentou, a habilidade das membranas restabelecerem a semi-permeabilidade ficou reduzida, havendo maiores perdas de K^+ durante os estádios iniciais de embebição.

Krzyzanowski et al. (1982) verificaram que o envelhecimento artificial foi eficiente para avaliar o vigor e, paralelamente, acompanhar a sua variação durante o armazenamento de sementes de feijão. O teste detectou, ainda, as diferenças de vigor entre lotes de soja (Kulik & Yaklich, 1982). Para Marcos Filho et al. (1984), contudo, subestimou os resultados de vigor de alguns lotes, o que foi atribuído aos efeitos drásticos do teste, acentuados em lotes com baixo poder germinativo. Boaro et al. (1984) verificaram, em sementes de feijão, que o envelhecimento artificial apresentou eficiência semelhante ou inferior à do teste padrão de germinação. Novembre & Marcos Filho (1991) observaram diferenças, não reveladas sob condições ambientais favoráveis ao desempenho de sementes de soja, com a utilização do teste de envelhecimento artificial. A literatura destaca, em geral, que a eficiência do teste é dependente do grau de sensibilidade das sementes ao envelhecimento. Contudo, deve ser observado que as diferenças, detectadas nos níveis de vigor, devem estar relacionadas a determinados objetivos como, por exemplo,

as avaliações do potencial de emergência ou da capacidade de armazenamento (Marcos Filho et al., 1987).

Os efeitos do envelhecimento artificial são afetados pelo teor de água das sementes; por esse motivo, têm sido recomendadas determinações de umidade das sementes, anterior e posteriormente ao envelhecimento, para o devido entendimento dos resultados obtidos (McDonald Jr., 1977; Marcos Filho et al., 1978; Marcos Filho & Vinha, 1980; Barboza, 1981). Estudando o assunto, Marcos Filho (1994) sugeriu que as sementes estejam com umidades de 11 a 13% no início do teste.

As principais vantagens do emprego do envelhecimento artificial na avaliação da qualidade das sementes, em relação ao envelhecimento natural, são as de diminuir o tempo na obtenção dos dados e de atenuar interferências de variáveis fisiológicas como longevidade, vitalidade e dormência das sementes (Berjak & Villiers, 1972 b).

Entre os mecanismos de envelhecimento artificial e natural, Priestley & Leopold (1983) sugeriram a existência de diferenças ao observarem que sementes de soja, envelhecidas naturalmente, apresentaram associação entre as perdas de vigor e viabilidade com o declínio da presença de ácidos graxos polisaturados, diferentemente do ocorrido no envelhecimento artificial.

Com o objetivo de determinar, indiretamente, as condições sanitárias das sementes, Menten (1978) procurou correlacionar testes de vigor e de germinação com a incidência de microrganismos em sementes de feijão; observou relação inversa entre a incidência de microrganismos e os resultados dos testes fisiológicos.

Marcos Filho (1994) ressaltou que temperatura e umidade elevadas podem inibir a manifestação de alguns microrganismos; assim, os dados obtidos no teste de envelhecimento podem ser superiores aos observados no teste de germinação com as mesmas amostras. Portanto, as condições impostas, pelo teste de envelhecimento artificial, não agiriam apenas no comportamento das sementes mas, também, influenciariam na ação de

microrganismos participantes da deterioração. A peroxidação de lipídios em sementes envelhecidas de soja e ervilha, ao provocar maior liberação de aldeídos voláteis, estimulou a germinação de esporos de fungos presentes durante a germinação das sementes (Harman et al., 1982).

Ao observar aumento na taxa de germinação em sementes tratadas com fungicidas e submetidas ao teste de envelhecimento artificial, Sinclair¹, citado por Menten (1978), considerou que o vigor da semente estaria associado, primordialmente, à ação de patógenos. Foi constatado que o tratamento fungicida elevou a germinação em sementes de soja inoculadas com *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus niger* e submetidas ao envelhecimento artificial (McDonald et al., 1993), confirmando as observações de Sinclair¹, citado por Menten (1978). Da mesma forma, Furlan (1986) observou que a presença de *Fusarium* spp. contribuiu na redução da qualidade fisiológica de sementes de feijão postas a envelhecer artificialmente.

Assim, apesar das evidências da ação dos patógenos na avaliação do vigor das sementes, especialmente no teste de envelhecimento artificial, os métodos recomendados não estimam a participação relativa dos microrganismos nos resultados obtidos para o desempenho fisiológico (McDonald et al., 1993). Por esse motivo, pesquisas sobre o assunto podem se constituir em instrumental útil para o esclarecimento das dúvidas existentes.

¹ Sinclair, J. B. Tratamento químico de sementes de soja. Seminário apresentado na Reunião sobre Patologia de Sementes. Londrina: IAPAR, 24-26/11/1975.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho, conduzido na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”/USP, utilizou sementes de um lote de feijão do cultivar IAC-CARIOCA; foram realizados quatro experimentos que diferiram, entre si, quanto à espécie fúngica utilizada na inoculação artificial das sementes.

3.1. Obtenção dos pré-tratamentos e dos tratamentos

As sementes, de acordo com o experimento considerado, foram submetidas aos seguintes procedimentos denominados como pré-tratamentos que, por sua vez, representaram as etapas metodológicas para a inoculação de fungos às sementes:

- Assepsia (experimentos 1, 2, 3 e 4): as sementes foram desinfectadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,02% por 3 minutos, lavadas com água destilada e, posteriormente, postas para secar em papel toalha por 2 horas.

- Assepsia + BDA (experimentos 1, 2 e 3): após desinfecção superficial, as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 15 g de ágar, 20 g de dextrose, 1000 ml de água destilada) isento de fungo, onde permaneceram por 48 horas em câmara de incubação sob $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz alternada em ciclos de 12 horas de luz branca fluorescente/12 horas de escuro (Teste, 1988).

- Assepsia + BDA + fungo (experimentos 1, 2 e 3): inoculação artificial com os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., e *Fusarium oxysporum*, respectivamente, nos experimentos 1, 2 e 3. Primeiramente, foi obtida a cultura pura do fungo, em tubos de ensaio, com posterior

desenvolvimento em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Quando o material repicado do fungo se desenvolveu, na superfície do meio de cultura BDA, nova repicagem foi feita para as placas onde se deu a inoculação artificial pelo método de contato. Este consistiu em colocar 60 sementes previamente desinfectadas superficialmente em cada placa de Petri, num procedimento semelhante ao realizado por Tanaka et al. (1989) com algodão; para que houvesse adesão do inóculo à superfície das sementes, as placas foram agitadas manualmente. O período de incubação foi de 48 horas sob $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e luz alternada em ciclos de 12 horas de luz branca fluorescente/12 horas de escuro (Teste, 1988).

- Assepsia + meio de cultura de vagem de feijão + fungo (experimento 4): o meio de cultura de vagem (200 g de vagem, 16 g de ágar, 20 g de dextrose, 1000 ml de água destilada) foi utilizado para a inoculação artificial, pelo método de contato, do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Primeiramente, para a preparação deste meio, vagens de feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.), próprias para o consumo "in natura", foram batidas com água destilada no liquidificador, cozidas em banho-maria por trinta minutos e, depois, filtradas; o extrato foi misturado com ágar e dextrose, para se proceder a autoclavagem por quarenta minutos. O período de incubação, de 48 horas, foi conduzido à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e sob luz alternada em ciclos de 12 horas de luz ultravioleta/12 horas de escuro (Teste, 1988).

Em todos os pré-tratamentos, com exceção do de assepsia exclusiva, o período de incubação foi seguido por secagem (30°C em estufa com circulação de ar) até que as sementes, inicialmente com teores de água entre 38,2 e 43,4%, atingissem valores de 11 a 13%.

Os tratamentos foram obtidos pela submissão das sementes dos pré-tratamentos de cada experimento a condições semelhantes às do teste de envelhecimento artificial, em câmara sob 42°C e 100% de U.R., por períodos

variáveis de 0, 24, 48, 72 e 96 horas. As sementes foram dispostas em mini-câmaras (gerbox adaptado) com 40 ml de água destilada em seu interior.

Ao término dos períodos de envelhecimento, procedeu-se secagem das sementes em estufa com circulação de ar (temperatura de 30°C) previamente à realização das determinações. Especificamente para o teste de germinação, a condução foi realizada, adicionalmente, com sementes não submetidas à secagem.

3.2. Determinações

As determinações descritas a seguir foram, invariavelmente, conduzidas na caracterização do lote original. Por outro lado, nas avaliações dos pré-tratamentos e dos tratamentos foram suprimidas as realizações dos testes de pureza física e de envelhecimento artificial.

a) Pureza física: determinada conforme as prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992); forneceu a porcentagem de sementes puras.

b) Sanidade: a avaliação do estado sanitário das sementes foi feita através do método do papel de filtro (Neergaard, 1979) sem congelamento ("blotter test"), a 20°C, sob 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro; a semeadura foi efetuada sobre quatro folhas de papel de filtro umedecidas em água destilada. Foram avaliadas 50 sementes por repetição; após 7 dias de incubação, foram verificadas a identidade e a frequência, de cada microrganismo encontrado, com os auxílios de microscópios estereoscópico ou composto.

c) Grau de umidade: foi avaliado através do método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 horas, utilizando duas amostras por repetição, segundo

as prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os dados, calculados por diferença de peso com base no peso úmido das sementes, foram indicados em porcentagem.

d) Germinação: foi realizada com 50 sementes por repetição, sob temperatura de 25°C, utilizando substrato de papel toalha Germitest, em forma de rolo, umedecido na proporção de duas vezes e meia o peso do papel em volume de água. As contagens, feitas aos quatro e sete dias após a semeadura, computaram a porcentagem final de plântulas normais, conforme os procedimentos descritos em Brasil (1992).

e) Tetrazólio: a viabilidade das sementes foi determinada com o emprego de 25 sementes/repetição pré-condicionadas, em papel toalha umedecido, por 16 horas em germinador sob temperatura de 25°C. Após o pré-condicionamento, as sementes foram imersas em solução de tetrazólio (0,075%), sob temperatura de 41°C por 3 horas, em estufa sem iluminação interna. Vencido o prazo, as sementes foram retiradas do ambiente aquecido e, em seguida, lavadas com água e mantidas submersas em água refrigerada (10°C) até o momento da avaliação que, por sua vez, considerou os critérios de viabilidade estabelecidos por França Neto et al. (1988).

f) Envelhecimento artificial: quatro repetições de 50 sementes, dispostas em mini-câmaras (gerbox adaptado) com 40 ml de água destilada no seu interior, foram mantidas em câmara sob 42°C e 100% U.R., durante 72 horas, de acordo com as recomendações de Marcos Filho et al. (1987). A seguir, foram submetidas ao teste de germinação, anteriormente descrito, para obtenção da porcentagem de plântulas normais presentes no quarto dia após a semeadura.

g) Comprimento da plântula: foi realizado, em rolo de papel, umedecido como no teste de germinação, empregando 10 sementes por repetição. A semeadura foi efetuada sobre uma linha traçada no terço superior do papel em sentido longitudinal. Os rolos, embalados em sacos plásticos, foram postos verticalmente no germinador (Krzyzanowski et al., 1991) e mantidos por quatro dias sob temperatura de 25°C. Decorrido este período, as plântulas normais obtidas foram medidas com auxílio de régua graduada em mm. O comprimento médio da plântula foi obtido pelo quociente entre a soma das medidas tomadas em cada repetição e o número de plântulas normais.

h) Peso da matéria seca da plântula: este teste foi instalado de modo similar ao adotado na determinação do comprimento das plântulas. Após quatro dias de permanência no germinador, os cotilédones foram eliminados previamente à determinação do peso da matéria seca das plântulas normais. Para tanto, a parte restante das plântulas foi levada, no interior de sacos de papel, para estufa com circulação de ar sob 80°C durante 24 horas. Finalmente, após o esfriamento em dessecador, as plântulas foram pesadas e determinado o peso médio da matéria seca (mg/plântula), conforme metodologia descrita por Nakagawa (1994).

i) Emergência das plântulas: constou da instalação de 50 sementes por repetição, em campo mantido sob irrigação, em linhas de 2,0 m espaçadas de 0,3 m entre si. A avaliação, realizada aos 21 dias após a semeadura, computou a porcentagem de plântulas emersas, em método semelhante ao adotado por Nakagawa (1994).

j) Condutividade elétrica: foi conduzida com a utilização de 25 sementes por repetição. Após a pesagem, as sementes foram imersas em 75 ml de água destilada para permanência em germinador, durante 24 horas, à

temperatura de 20°C. Ao término do período, a condutividade elétrica da solução foi determinada em condutivímetro; os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{mhos/cm/g}$ de sementes (Marcos Filho et al., 1987).

I) Lixiviação de potássio: para a avaliação, a metodologia empregada foi a desenvolvida por Amorin (1978) e adaptada por Marcos Filho et al. (1982) e Marcos Filho et al. (1984). Foram utilizadas 25 sementes por repetição que, após pesagem em balança de precisão 0,01 g, foram colocadas em copos plásticos com 75 ml de água destilada, durante 90 minutos, em germinador a 30°C. A agitação da água foi feita no início e no final deste período; em seguida, foi realizada a determinação em fotômetro de chama. Os dados foram expressos em ppm de potássio por grama de sementes.

3.3. Delineamento experimental e procedimento estatístico

Os dados obtidos para a caracterização do lote original, para a sanidade e para o grau de umidade, na avaliação dos pré-tratamentos e tratamentos, não foram analisados estatisticamente.

Foi adotado, invariavelmente, delineamento experimental inteiramente ao acaso (fatorial) com quatro repetições. A análise de variância (Tabelas 1a e 1b) foi conduzida isoladamente para cada experimento. A comparação de médias foi efetuada pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 1a. Esquema da análise de variância utilizado nos experimentos 1, 2 e 3.

Causas de variação	Graus de liberdade
Pré-tratamentos (P)	2
Tratamentos (T)	4
Interação (P x T)	8
Resíduo	45
Total	59

Tabela 1b. Esquema da análise de variância utilizado no experimento 4.

Causas de variação	Graus de liberdade
Pré-tratamentos (P)	1
Tratamentos (T)	4
Interação (P x T)	4
Resíduo	30
Total	39

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do lote original

Os dados de caracterização das sementes empregadas acham-se apresentados na Tabela 2. Considerando o objetivo que demandou o controle experimental das populações dos fungos, as presenças indesejadas no lote original, de *Aspergillus* spp. e de *Penicillium* spp., sugeriram a necessidade de aplicação do método de assepsia que, até o momento, tem apresentado eficiência variável na sua ação. Sob os demais aspectos, o lote empregado mostrou-se física e fisiologicamente compatível com os requisitos qualitativos estipulados no Brasil para a comercialização das sementes do feijoeiro.

4.2. Análise sanitária

Os dados referentes à análise sanitária das sementes (Tabelas 3 e 4) revelaram que a assepsia não foi eficiente na eliminação da presença de *Aspergillus* spp.; com isso, a sua incidência, apesar de indesejada, foi sendo ampliada com o aumento do tempo de envelhecimento, em todos os experimentos, principalmente quando o BDA e o meio de vagem foram empregados. Por outro lado, no caso do *Penicillium* spp., identicamente não eliminado pela assepsia, a população tendeu à redução à medida em que o tempo de envelhecimento e, paralelamente, a população de *Aspergillus* spp. foram sendo ampliados.

Tabela 2. Dados de qualidade das sementes do lote original.

Determinações	Dados Médios
1. Pureza física (%)	99,9
2. Sanidade (fungos patogênicos):	
<i>Aspergillus</i> spp. (%)	11,0
<i>Penicillium</i> spp. (%)	2,0
3. Grau de umidade (%)	12,7
4. Germinação (%)	95,0
5. Tetrazólio (%)	92,0
6. Envelhecimento artificial (%)	57,0
7. Comprimento da plântula (mm)	172,5
8. Peso da matéria seca da plântula (mg)	36,9
9. Emergência das plântulas (%)	91,0
10. Condutividade elétrica (μ mhos/cm/g)	74,9
11. Lixiviação de potássio (ppm/g)	112,6

O crescimento da incidência de *Aspergillus* spp., com o aumento do período de envelhecimento (Tabelas 3 e 4), manteve-se evidente mesmo quando os demais fungos foram inoculados. Nestas situações, apenas a presença de *Fusarium oxysporum* conseguiu impedir que a população de *Aspergillus* spp., presente em todos os experimentos, atingisse 100% de incidência em 96 horas de envelhecimento.

Estes fatos, além de confirmarem o favorecimento que as condições de envelhecimento artificial propiciam ao desenvolvimento de microrganismos, destacaram a tendência de domínio do *Aspergillus* spp. sobre os demais fungos presentes. Por outro lado, revelando a falibilidade do método de assepsia (Lima et al., 1982), o comportamento do *Aspergillus* spp. prejudicou o estudo, isolado da interferência dos patógenos, dos efeitos

Tabela 3. Análise sanitária das sementes: dados (%) da incidência de fungos obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Fungos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
			0	24	48	72	96
1	Assepsia	<i>Aspergillus</i> spp.	14,0	21,0	20,0	28,5	79,5
		<i>Penicillium</i> spp.	4,0	8,5	5,0	11,0	1,0
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Assepsia + BDA	<i>Aspergillus</i> spp.	75,5	72,0	80,0	99,5	100,0
		<i>Penicillium</i> spp.	7,0	8,0	1,0	0,0	0,0
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		<i>Penicillium</i> spp.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Assepsia	<i>Aspergillus</i> spp.	25,0	17,0	14,5	21,0	100,0
		<i>Penicillium</i> spp.	5,0	3,5	5,0	6,5	0,0
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	Assepsia + BDA	<i>Aspergillus</i> spp.	8,5	6,5	8,0	18,0	99,0
		<i>Penicillium</i> spp.	7,5	9,5	4,5	4,5	0,5
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	1,0	4,0	10,5	72,0	100,0
		<i>Penicillium</i> spp.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 4. Análise sanitária das sementes: dados (%) da incidência de fungos obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Fungos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
			0	24	48	72	96
3	Assepsia	<i>Aspergillus</i> spp.	7,0	7,5	6,5	8,0	94,0
		<i>Penicillium</i> spp.	1,0	4,5	3,0	2,0	0,5
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Assepsia + BDA	<i>Aspergillus</i> spp.	10,0	16,0	21,5	71,5	86,0
		<i>Penicillium</i> spp.	9,0	10,0	8,0	3,0	1,0
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Assepsia + BDA + <i>F. oxysporum</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	1,0	3,0	2,5	9,5	58,0
		<i>Penicillium</i> spp.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>F. oxysporum</i>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	Assepsia	<i>Aspergillus</i> spp.	9,0	3,0	6,0	35,0	87,0
		<i>Penicillium</i> spp.	2,0	6,0	7,5	4,0	0,0
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>C. lindemuthianum</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	9,5	14,5	22,0	52,5	100,0
		<i>Penicillium</i> spp.	13,0	9,0	7,5	5,0	2,5
		<i>F. oxysporum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>C. lindemuthianum</i>	4,0	0,5	0,0	0,0	0,0

fisiológicos do envelhecimento das sementes.

O método de inoculação, quando considerados os experimentos 1, 2 e 3, mostrou-se eficiente ao proporcionar a contaminação prevista em todas as sementes. Por outro lado, a inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* (experimento 4), além de contaminar um reduzido número de sementes, teve a sua eficiência reduzida com o tempo de envelhecimento ao ponto de, a partir de 48 horas, não poder ser detectada a presença do microrganismo.

No experimento 1, a ampliação do tempo de envelhecimento proporcionou, em assepsia e em assepsia + BDA, elevação da ocorrência de *Aspergillus* spp. nas sementes. Em assepsia + BDA + *Aspergillus* spp. a ocorrência de 100% do fungo foi mantida em todos os tempos, similarmente ao verificado no experimento 3 para *Fusarium oxysporum*. Para o caso do *Penicillium* spp. (experimento 2), apesar de conseguida a inoculação do fungo em todas as sementes, a população do microrganismo tendeu ao decréscimo à medida em que o tempo de envelhecimento foi sendo prolongado.

Dessa forma, apesar da impossibilidade de verificação do fato em relação aos fungos de campo (*Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*), a técnica de assepsia não mostrou-se adequada à eliminação dos fungos de armazenamento (*Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.). A ampliação do período de envelhecimento, ao mesmo tempo em que favoreceu a estabilidade (*Aspergillus* spp. e *Fusarium oxysporum*) ou elevação da população (*Aspergillus* spp.), mostrou-se como fator adverso ao desenvolvimento de *Penicillium* spp. e de *Colletotrichum lindemuthianum*.

4.3. Teor de água das sementes

Nos quatro experimentos, o teor de água das sementes cresceu com a ampliação do tempo de envelhecimento (Tabela 5); a taxa de elevação do teor de água tendeu à redução, com o passar do tempo de envelhecimento, indicando aproximação ao ponto de equilíbrio higroscópico entre a semente e

as condições atmosféricas do envelhecimento. A variação do teor de água, entre os pré-tratamentos, comportou-se de forma similar. Após a secagem, o teor de água foi padronizado (Tabela 6) permitindo, assim, atenuação do efeito dessa variável física nas comparações posteriormente efetuadas nas avaliações fisiológicas.

4.4. Germinação

A germinação conduzida com ausência de secagem prévia (Tabela 7), representando o método normalmente recomendado para o teste de envelhecimento artificial, permitiu identificar efeitos interativos entre os tratamentos e os pré-tratamentos utilizados. Similarmente, permaneceram na germinação conduzida com a secagem após o envelhecimento (Tabela 8). De um modo geral, em todos os experimentos, os aumentos de *Aspergillus* spp. e do tempo de envelhecimento atuaram na redução progressiva das duas germinações em todos os pré-tratamentos.

Nos experimentos 1 e 2 (*Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.) as germinações, independentemente da secagem, foram negativamente afetadas pela elevação da ocorrência (Tabela 3) dos patógenos. Contudo, apesar da inclusão do BDA haver promovido o crescimento populacional dos microrganismos, pareceu atenuar, a partir de 24 horas (experimento 1) e de 48 horas (experimento 2) de exposição, a ação fisiologicamente depressiva, encontrada nos demais pré- tratamentos, proveniente da associação de efeitos dos patógenos com os tempos de envelhecimento.

No experimento 3, a ausência de *Fusarium oxysporum* (Tabela 4), nos pré-tratamentos de assepsia e assepsia + BDA, permitiu identificar a ação negativa, resultante da ação conjunta de *Aspergillus* spp. e do tempo de envelhecimento, nas germinações conduzidas sem e com secagem prévia. Ainda na comparação entre os dois pré-tratamentos, o uso do BDA confirmou

Tabela 5. Determinação do grau de umidade: dados (%) do teor de água obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	11,3	20,0	25,0	28,1	29,6
	Assepsia + BDA	12,3	23,8	29,0	32,0	33,0
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	11,5	23,8	28,3	30,4	31,1
2	Assepsia	11,3	19,8	25,1	27,9	29,4
	Assepsia + BDA	11,0	22,7	27,5	30,5	32,9
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	11,0	22,6	28,2	31,1	32,1
3	Assepsia	10,9	20,4	25,7	29,2	30,8
	Assepsia + BDA	10,4	23,0	27,9	31,4	32,4
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	11,3	25,0	29,4	31,6	33,6
4	Assepsia	12,0	22,4	27,4	29,8	33,1
	Assepsia + meio de cultura de vagem + + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	12,4	24,3	28,4	29,9	33,9

Tabela 6. Determinação do grau de umidade: dados (%) do teor de água obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia					
	Assepsia + BDA	12,4	12,6	12,9	12,8	12,9
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	12,7	12,4	12,3	12,3	12,4
2	Assepsia					
	Assepsia + BDA	12,3	11,4	11,3	11,6	11,8
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	11,8	10,0	12,5	9,9	11,1
3	Assepsia					
	Assepsia + BDA	11,2	10,1	10,2	10,0	10,1
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	11,5	11,0	10,9	11,3	11,5
4	Assepsia					
	Assepsia + BDA	11,1	11,5	11,9	11,4	11,6
	Assepsia + BDA + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	10,7	11,2	11,5	11,9	11,8
4	Assepsia					
	Assepsia + meio de cultura de vagem +	11,5	11,7	11,8	11,6	11,8
	+ <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	12,0	12,0	12,3	11,9	12,4
4	Assepsia					
	Assepsia + meio de cultura de vagem +	12,0	12,2	12,6	12,4	12,7
	+ <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>					

Tabela 7. Teste de germinação: dados (%) da taxa de plântulas normais obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, sem a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	93,9 a A	81,5 b B	59,0 c B	34,9 d B	5,7 e B
	Assepsia + BDA	87,2 a A	91,8 a A	84,0 a A	67,2 b A	27,4 c A
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	91,9 a A	25,4 b C	6,1 c C	0,5 d C	0,0 d C
2	Assepsia	90,6 a A	84,2 a A	68,7 b B	40,5 c B	10,1 d C
	Assepsia + BDA	81,3 ab A	90,7 a A	81,8 ab A	72,1 bc A	56,6 c A
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	56,0 a B	50,5 a B	42,9 a C	48,0 a B	21,3 b B
3	Assepsia	88,3 a A	83,6 a A	62,0 b B	48,5 b B	20,4 c B
	Assepsia + BDA	89,8 a A	90,8 a A	73,2 bc A	77,6 b A	61,6 c A
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	75,8 a B	71,6 a B	66,7 a AB	45,0 b B	28,7 c B
4	Assepsia	91,1 a A	91,5 a A	75,2 b B	51,5 c B	38,8 c B
	Assepsia + meio de cultura de vagem + + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	83,5 a B	82,6 a B	79,6 a A	66,0 b A	56,5 b A

Para cada experimento, médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e por mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 8. Teste de germinação: dados (%) da taxa de plântulas normais obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	94,6 a A	78,6 b B	50,0 c B	16,6 d B	11,0 d B
	Assepsia + BDA	84,1 a B	86,7 a A	63,0 b A	50,5 c A	18,7 d A
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	89,3 a B	25,9 b C	4,7 c C	0,0 d C	0,0 d C
2	Assepsia	94,9 a A	80,0 b A	67,1 c B	33,2 d B	9,5 e B
	Assepsia + BDA	94,8 a A	81,5 b A	78,6 b A	62,6 c A	50,5 c A
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	47,5 a B	34,4 b B	16,3 c C	16,9 c C	5,9 d B
3	Assepsia	91,7 a A	78,8 b A	47,0 c B	28,3 d C	16,3 e C
	Assepsia + BDA	92,2 a A	79,2 b A	72,7 bc A	64,7 cd A	54,0 d A
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	70,2 ab B	73,0 a A	59,0 bc B	45,5 c B	29,9 d B
4	Assepsia	92,8 a A	78,6 b A	66,0 c B	54,5 c B	34,8 d B
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	87,4 a B	84,1 a A	80,1 a A	68,5 b A	59,5 b A

Para cada experimento, médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e por mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

ação positiva sobre a germinação ao proporcionar superioridade, invariável a partir de 48 horas, em relação à assepsia exclusiva. Paralelamente, a aparente ação negativa do *Fusarium oxysporum* na germinação foi, na maior parte dos períodos de envelhecimento, expressa pela inferioridade da assepsia + BDA + *Fusarium oxysporum* em relação à assepsia + BDA que, conforme a Tabela 3, não contava com a incidência do patógeno.

O experimento 4 (*Colletotrichum lindemuthianum*), particularmente prejudicado em seus objetivos pela ineficiência do método adotado para a inoculação do microrganismo, não evidenciou os efeitos do patógeno. Contudo, quando verificada a ausência de *Colletotrichum lindemuthianum* em todos os tempos de envelhecimento no pré-tratamento de assepsia e, a partir de 48 horas no pré-tratamento de assepsia + meio de cultura de vagem + *Colletotrichum lindemuthianum* (Tabela 4), indicou efeitos fisiológicos positivos do meio de cultura de vagem, nas duas germinações conduzidas, em comportamento similar ao verificado para o BDA nos experimentos 1, 2 e 3.

Assim, os testes de germinação indicaram que as ampliações das incidências de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium oxysporum*, além de isoladamente contribuírem para a redução da qualidade fisiológica, têm a ação agravada com o aumento do tempo de envelhecimento artificial. Paralelamente, os testes sugeriram ausências dos efeitos da secagem nas comparações entre os desempenhos dos pré-tratamentos e dos tratamentos e, adicionalmente, efeitos fisiológicos positivos do uso do pré-tratamento com os meios de cultura.

Além do teor de água e do período de envelhecimento, o grau de contaminação inicial (anterior ao envelhecimento) é fator que pode determinar a perda de viabilidade das sementes. Nas sementes mortas, que haviam sido inoculadas com *Aspergillus* spp., o fungo se desenvolveu extensivamente, pelo tegumento, com o surgimento de estruturas de resistência nos períodos de 72 e 96 horas de envelhecimento. É possível que o avançado estágio de deterioração, determinado pela elevada intensidade da inoculação com o

fungo, tenha promovido a morte das sementes. McDonald et al. (1993) verificaram diferenças significativas na germinação de sementes de soja contaminadas, em diferentes níveis, com *Aspergillus niger*; após envelhecimento artificial por 64 horas, a elevação da contaminação correspondeu à redução na germinação.

Particularmente no experimento 2 (*Penicillium* spp.), houve o aparecimento de coloração vermelha nos tegumentos e na região de contato dos tegumentos com o papel de germinação. O fato, de consequências não devidamente avaliadas, sugeriu, pela exclusividade de ocorrência experimental, associação entre as presenças do fungo e da substância promotora da coloração.

4.5. Viabilidade (tetrazólio)

Os dados do teste de tetrazólio (Tabela 9), em valores absolutos, tenderam a ser maiores que os encontrados nos testes de germinação; contudo, os prejuízos fisiológicos, relacionados à elevação do tempo de envelhecimento, apresentaram a mesma tendência em ambos os tipos de teste (Tabelas 7, 8 e 9).

Especialmente nos experimentos 2 (*Penicillium* spp.) e 3 (*Fusarium oxysporum*), a comparação, entre os pré-tratamentos de assepsia + BDA e de assepsia + BDA + patógeno, não sugeriu, como o esperado (Tanaka & Corrêa, 1981 e Furlan, 1986), ação negativa da presença dos patógenos (Tabelas 3 e 4) na viabilidade (Tabela 9). Por outro lado, no experimento 1 (*Aspergillus* spp.), apesar da constatação do crescimento populacional do microrganismo com a ampliação do tempo de envelhecimento (Tabela 3) em todos os pré-tratamentos, as diferenças de incidência do patógeno, entre assepsia e assepsia + BDA + *Aspergillus* spp., indicaram, aparentemente, associação entre a elevação populacional do fungo e a redução da viabilidade (Tabelas 3 e 9).

Tabela 9. Teste de tetrazólio: dados (%) da taxa de viabilidade obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	84,5 a A	71,1 ab B	64,1 bc B	60,0 bc B	53,0 c B
	Assepsia + BDA	89,2 ab A	91,1 a A	94,1 a A	89,2 ab A	77,1 b A
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	91,1 a A	43,0 b C	39,8 b C	18,4 c C	1,0 d C
2	Assepsia	93,4 a A	76,2 b B	67,0 bc B	51,0 c B	50,0 c B
	Assepsia + BDA	95,6 a A	89,2 ab A	85,1 ab A	86,5 ab A	79,2 b A
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	92,2 ab A	93,9 a A	85,1 abc A	81,2 bc A	74,3 c A
3	Assepsia	94,2 a A	76,5 b A	67,1 bc B	62,3 bc B	56,0 c B
	Assepsia + BDA	89,0 a AB	83,1 ab A	75,1 bc AB	78,3 abc A	69,1 c AB
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	85,4 a B	84,4 ab A	85,4 a A	78,0 ab A	71,1 b A
4	Assepsia	90,1 a A	83,1 ab A	85,0 ab A	73,5 bc A	61,0 c B
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	87,0 a A	86,2 a A	88,0 a A	81,3 a A	79,3 a A

Para cada experimento, médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e por mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Considerando todos os experimentos, as comparações entre assepsia e assepsia + meio de cultura indicaram, na maior parte dos casos, efeitos favoráveis do meio de cultura na viabilidade, confirmando o observado nos testes de germinação. Levando em conta que o teste de tetrazólio é conduzido a partir da avaliação de tecidos do embrião, o fato pode indicar, apesar da inexistência de relatos específicos na literatura, ação histológica reparadora do método de aplicação do meio de cultura.

O experimento 4 (*Colletotrichum lindemuthianum*), inadequado para quantificar efeitos do patógeno pelos motivos apresentados na discussão do teste de sanidade, detectou redução da intensidade dos efeitos negativos da ampliação do período de envelhecimento na viabilidade (Tabela 9), encontrada nos demais experimentos, no pré-tratamento assepsia + meio de cultura de vagem + *Colletotrichum lindemuthianum*.

4.6. Comprimento e peso da matéria seca da plântula

Os dados dos testes de comprimento e de peso da matéria seca (Tabelas 10 e 11), ambos relacionados ao crescimento das plântulas, apresentaram similaridade de indicações em todos os experimentos.

Nos experimentos 1, 2 e 3, apesar de menos pronunciadamente do que o verificado nos testes de germinação e de tetrazólio, a elevação do tempo de exposição ao envelhecimento afetou, desfavoravelmente, o desempenho fisiológico nos pré-tratamentos de assepsia e de assepsia + BDA + patógeno. Contudo, excetuando-se o verificado no experimento 1 (*Aspergillus* spp.) para o tempo de 96 horas, o uso de assepsia + BDA confirmou, na maior parte dos casos, o favorecimento do meio de cultura na atenuação dos efeitos da deterioração sobre o comportamento fisiológico das sementes. Apesar de mais notadamente em *Aspergillus* spp. do que em *Penicillium* spp. e *Fusarium oxysporum*, a elevação populacional dos patógenos esteve associada à redução no desempenho das sementes, de modo semelhante ao verificado na germinação.

Tabela 10. Comprimento da plântula: dados (mm/plântula) obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	214,5 a A	191,3 ab A	147,0 bc A	128,0 c A	38,8 d A
	Assepsia + BDA	142,3 a B	140,8 a B	127,0 a A	124,0 a A	0,0 b A
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	121,0 a B	130,3 a B	34,8 b B	0,0 b B	0,0 b A
2	Assepsia	155,3 a A	133,0 ab A	125,8 ab A	123,3 ab A	38,8 b B
	Assepsia + BDA	147,5 a A	149,3 a A	132,5 a A	119,8 a A	130,8 a A
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	139,0 ab A	153,0 a A	62,8 abc A	55,3 bc A	26,3 c B
3	Assepsia	134,6 a A	144,3 a A	74,0 ab A	14,5 b B	13,3 b B
	Assepsia + BDA	147,3 a A	135,4 a A	135,7 a A	114,6 a A	92,8 a A
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	155,0 ab A	172,0 a A	107,4 abc A	79,1 bc AB	56,8 c AB
4	Assepsia	182,5 a A	160,0 ab A	181,5 a A	89,8 c B	100,3 bc B
	Assepsia + meio de cultura de vagem + + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	160,5 a A	162,5 a A	176,0 a A	189,5 a A	178,5 a A

Para cada experimento, médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e por mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 11. Matéria seca da plântula: dados (mg/plântula) obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	20,5 a A	21,8 a AB	18,8 a A	28,6 a A	7,5 b A
	Assepsia + BDA	17,1 a A	14,0 a B	16,6 a A	17,0 a B	0,0 b A
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	21,0 ab A	24,6 a A	10,0 bc A	0,0 c C	0,0 c A
2	Assepsia	32,9 a A	29,4 a A	26,1 a AB	21,3 a AB	2,5 b B
	Assepsia + BDA	29,1 a A	35,7 a A	29,4 a A	24,0 a A	26,3 a A
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	20,6 ab A	30,2 a A	15,0 abc B	7,5 bc B	2,5 c B
3	Assepsia	29,7 a A	28,9 a A	23,1 ab A	7,5 b A	5,0 b B
	Assepsia + BDA	28,8 a A	23,3 a A	21,8 a A	21,8 a A	22,2 a A
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	23,9 a A	20,1 a A	11,9 a A	11,3 a A	15,0 a AB
4	Assepsia	36,1 a A	32,1 a A	33,8 a A	25,0 a B	26,3 a B
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	30,3 a A	34,2 a A	41,8 a A	47,5 a A	45,4 a A

Para cada experimento, médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e por mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

O experimento 4 (*Colletotrichum lindemuthianum*), além de prejudicado pela ineficiência na inoculação do fungo, apresentou desordenação nos dados que dificultou a interpretação. Contudo, no pré-tratamento assepsia + meio de cultura de vagem + *Colletotrichum lindemuthianum*, merece destaque a ausência de efeitos da ampliação do tempo de envelhecimento sobre o desempenho fisiológico, em confirmação à atuação favorável do meio de cultura de vagem detectada nos testes de germinação (Tabelas 7 e 8) e de tetrazólio (Tabela 9).

4.7. Emergência das plântulas

De um modo geral, em todos os experimentos, as ampliações da população de *Aspergillus* spp. e do período de envelhecimento tenderam a reduzir o desempenho das sementes (Tabelas 3, 4 e 12). A interferência positiva do BDA no sentido de atenuar esse efeito, verificada nos testes de germinação, tetrazólio, comprimento e peso da matéria seca das plântulas, foi observada, exclusivamente, no experimento 2 (*Penicillium* spp.).

A atuação negativa dos patógenos na qualidade das sementes, detectada pela maioria dos testes fisiológicos realizados, ficou expressa, com clareza, na emergência das plântulas do experimento 1 (*Aspergillus* spp.) e, moderadamente, na do experimento 2 (*Penicillium* spp.). No caso do experimento 3, contrariamente ao esperado, a presença do *Fusarium oxysporum* elevou o desempenho em algumas das situações de envelhecimento.

O experimento 4, conforme o já comentado, não foi considerado apto a fornecer dados da atuação do *Colletotrichum lindemuthianum*. Contudo, confirmou os efeitos adversos do prolongamento do tempo de envelhecimento sobre a qualidade fisiológica e, adicionalmente, a ação favorável do uso do meio de cultura de vagem no desempenho das sementes.

Tabela 12. Teste de emergência: dados (%) da emergência de plântulas obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia					
	Assepsia + BDA	90,5 a A	84,5 a A	48,9 b B	19,8 c B	12,0 c B
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	95,1 a A	86,1 ab A	74,8 bc A	59,4 cd A	43,2 d A
2	Assepsia					
	Assepsia + BDA	47,5 a B	41,5 a B	17,0 b C	1,8 c C	0,0 c C
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	92,1 a A	87,5 a A	61,5 b B	42,0 c B	23,7 d C
3	Assepsia					
	Assepsia + BDA	89,3 a A	92,2 a A	87,1 a A	68,8 b A	63,2 b A
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	89,5 a A	88,4 a A	71,2 b B	59,5 bc A	46,5 c B
4	Assepsia					
	Assepsia + BDA	73,1 a A	62,1 a B	14,4 b B	7,9 b C	1,1 c B
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	78,5 a A	66,1 ab B	58,3 b A	39,9 c B	18,2 d A
4	Assepsia					
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	83,1 a A	79,7 a A	54,1 b A	60,6 b A	12,4 c A
	Assepsia					
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	75,7 a A	59,5 b B	39,9 c B	31,1 c B	17,2 d B
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	83,5 a A	77,1 ab A	66,8 bc A	58,6 c A	51,0 c A

Para cada experimento, médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e por mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Na comparação com os testes de germinação (Tabelas 7 e 8), o teste de emergência (Tabela 12) tendeu a apresentar, em valores absolutos, dados superiores quando as populações de *Penicillium* spp. e de *Fusarium oxysporum* eram iguais ou próximas a 100% (Tabelas 3 e 4). Esta constatação, apesar de não relacionada aos objetivos principais do trabalho, pode sugerir que as condições ambientais do teste de germinação, tidas como ideais ao processo (Association of Official Seeds Analysts, 1983), podem, paralelamente, favorecer a interferência adversa de microrganismos nos resultados finais. Segundo James (1982), as condições adversas do teste de envelhecimento são responsáveis por expressiva lixiviação eletrolítica durante o processo de embebição das sementes. Com a distribuição dos solutos celulares, pela celulose do substrato de germinação, os fungos podem ter acelerado a colonização do papel e, posteriormente, das sementes em germinação e, dessa forma, terem elevado o surgimento de anormalidades e mortes.

Sementes de soja envelhecidas artificialmente, inoculadas isoladamente com *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus niger*, apresentaram germinação superior em areia quando comparadas às que foram submetidas ao teste em rolo de papel. Os autores da pesquisa (McDonald et al., 1993), buscando explicações para as vantagens encontradas com o uso de areia, atribuíram ao rolo de papel características favoráveis ao estabelecimento de fungos, principalmente relacionadas à sua capacidade de absorver lixiviados das sementes, atuando como substrato para os microrganismos, e ao reduzido espaçamento proporcionado entre as sementes, promovendo facilidades à disseminação de patógenos no teste. Dessa forma, propuseram o uso do teste de germinação em areia, após o envelhecimento artificial, como forma de evitar interferências negativas do substrato nos resultados do teste.

4.8. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio

Os testes de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio (Tabelas 13 e 14), empregados com a finalidade de estimar a integridade das membranas celulares, indicaram, com algumas exceções, as tendências observadas nos demais testes fisiológicos. Em todos os experimentos, o progresso da deterioração, indicado pela elevação no valor dos dados, aconteceu à medida em que o período de envelhecimento era prolongado e, conseqüentemente, a incidência de *Aspergillus* spp. era ampliada (Tabelas 3 e 4).

Sementes deterioradas, quando postas para embeber água, apresentam, por deficiências nos mecanismos de reparo das membranas celulares, elevada lixiviação de solutos; assim, a deterioração pode ser medida através da quantidade de eletrólitos lixiviados (Chauhan et al., 1984; Bewley, 1986). Lin (1990), trabalhando com sementes de feijão envelhecidas artificialmente, observou relações diretas entre o aumento do período de envelhecimento e a quantidade de exsudatos da semente na água de embebição; atribuiu ao envelhecimento algumas mudanças nas membranas que, possivelmente, favorecem o aparecimento de danos aos tecidos embrionários durante a embebição.

As presenças de *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum* não se associaram à deterioração histológica; contudo, no caso do *Aspergillus* spp., essa associação foi positivamente observada. O teste de tetrazólio (Tabela 9), por sua vez, forneceu essas mesmas informações.

Os empregos de meios de cultura, tanto de BDA quanto de vagem, mantiveram, em todos os experimentos, a capacidade de minimizar os efeitos fisiológicos negativos oriundos do processo de envelhecimento, generalizadamente identificada na pesquisa.

Tabela 13. Teste de condutividade elétrica: dados (umhos/cm/g) obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia					
	Assepsia + BDA	76,5 d A	100,7 c A	141,0 b A	159,7 b A	193,8 a B
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	60,8 b A	79,0 ab B	85,7 a B	83,5 a B	91,8 a C
2	Assepsia					
	Assepsia + BDA	77,3 c A	101,2 c A	130,9 b A	158,5 a A	159,1 a A
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	55,9 b A	70,0 b B	102,6 a B	105,7 a B	105,6 a B
3	Assepsia					
	Assepsia + BDA	65,0 b AB	76,3 ab B	81,5 ab B	81,4 ab B	89,1 a B
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	58,9 c B	65,0 bc B	82,7 a B	80,2 ab B	88,5 a B
4	Assepsia					
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	84,7 c A	102,8 bc A	118,4 ab A	131,6 a A	123,3 a A
		58,6 b B	74,9 ab B	86,8 a B	81,7 a B	88,3 a B

Para cada experimento, médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e por mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 14. Teste de lixiviação de potássio: dados (ppm/g) obtidos com a aplicação dos pré-tratamentos (etapas da inoculação) e dos tratamentos (tempos de envelhecimento artificial) em sementes do feijoeiro, após a realização de secagem.

Experimentos	Pré-tratamentos	Tratamentos: tempos de envelhecimento artificial (hora)				
		0	24	48	72	96
1	Assepsia	118,2 e B	332,9 d AB	509,5 c A	730,8 b B	1035,8 a B
	Assepsia + BDA	240,8 a AB	250,3 a B	359,1 a B	341,1 a C	327,6 a C
	Assepsia + BDA + <i>Aspergillus</i> spp.	381,8 c A	444,8 c A	515,4 c A	1078,5 b A	1542,8 a A
2	Assepsia	199,9 c A	361,4 bc A	542,3 b A	1193,4 a A	1207,0 a A
	Assepsia + BDA	254,9 b A	372,0 ab A	496,4 a A	476,0 a B	492,5 a B
	Assepsia + BDA + <i>Penicillium</i> spp.	243,7 c A	321,3 bc A	444,3 ab A	479,8 ab B	544,5 a B
3	Assepsia	455,6 d A	883,5 c A	1029,2 b A	1284,5 a A	1110,9 b A
	Assepsia + BDA	294,3 b B	322,2 b B	465,8 a B	462,0 a B	460,9 a B
	Assepsia + BDA + <i>Fusarium oxysporum</i>	246,4 b B	358,6 ab B	370,4 a B	384,4 a B	473,9 a B
4	Assepsia	462,4 d A	869,8 c A	975,1 bc A	1237,5 a A	1034,7 b A
	Assepsia + meio de cultura de vagem + <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	337,3 a B	382,0 a B	472,9 a B	479,6 a B	430,5 a B

Para cada experimento, médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e por mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

4.9. Considerações gerais

A técnica de aplicação de meios de cultura, para a inoculação de fungos nas sementes, propicia a existência de hidratação seguida por secagem sob baixa temperatura. Esta similaridade, com métodos de pré-condicionamento fisiológico (Heydecker et al., 1975; Tilden & West, 1985; Pandey, 1988), pode explicar a obtenção dos dados experimentais que sugeriram efeitos, dos meios de cultura, na atenuação dos prejuízos fisiológicos provenientes da ampliação do tempo de envelhecimento artificial; segundo Pandey (1989), os efeitos deletérios do envelhecimento artificial podem ser anulados, pelo pré-condicionamento, em decorrência da recuperação qualitativa das sementes. Contudo, particularmente na inoculação com *Aspergillus* spp., a agressividade na ação isolada do patógeno pareceu dificultar o surgimento do fenômeno.

Os resultados de desempenho, parcialmente influenciados pela deterioração fisiológica advinda do envelhecimento, sofreram interferências evidentes das presenças dos fungos patogênicos que, pela constância do surgimento de *Aspergillus* spp. em todos os experimentos, não puderam ser medidas, individualmente, com a precisão prevista pelo método empregado. Sob este aspecto, a necessidade do aprimoramento da técnica de assepsia de sementes deve ser destacada, como imprescindível, para a realização de pesquisas que demandem o controle da incidência de patógenos.

Dentre as incidências dos fungos estudados, a de *Aspergillus* spp. mostrou-se francamente favorecida pela ampliação do tempo de envelhecimento artificial ao ponto de, em todos os experimentos, dificultar a diferenciação entre as causas fisiológicas e as sanitárias envolvidas na deterioração das sementes. Apesar disso, ficou destacada a participação efetiva da presença dos fungos patogênicos, particularmente do *Aspergillus* spp., nos dados de desempenho após o envelhecimento artificial. Especialmente nos testes de tetrazólio, de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio, invariavelmente voltados à estimativa da situação histológica

existente no embrião, a presença de *Aspergillus* spp. pareceu diretamente envolvida com os danos celulares detectados.

Dessa maneira, a interferência do envelhecimento artificial, no desempenho posterior das sementes, associa causas fisiológicas e sanitárias que, quando não devidamente quantificadas, contribuem para gerar dificuldades na interpretação dos dados de vigor obtidos.

5. CONCLUSÕES

Considerando a aplicação do teste de envelhecimento artificial em sementes do feijoeiro pode-se concluir que:

- O teste associa a expressão de causas fisiológicas e sanitárias que, por sua vez, devem ter os efeitos separados para a devida interpretação dos dados obtidos na estimativa do vigor.

- As presenças de patógenos, particularmente de *Aspergillus* spp., podem ser consideradas como capazes de interferir, negativamente, no desempenho das sementes envelhecidas artificialmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed.) **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v. 2, cap. 4, p. 283-315.
- ABDUL-BAKI, A. A.; BAKER, J. E. Are changes in cellular organelles or membranes related to vigor loss in seed? **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 89-125, 1973.
- AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 2, 168p.
- ALBERINI, J. L.; LOLLATO, M. A. A importância da semente. **IAPAR Circular** n. 18, p. 21-23, 1980.
- AMORIM, H. V. Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração da qualidade. Piracicaba, 1978. 85 p. Tese (Livre Docência)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ANDERSON, J. D. Adenylate metabolism of embryonic axes from deteriorated soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 59, p. 610-614, 1977.

- ANDERSON, J. D.; BAKER, J. E.; WORTHINGTON, E. K. Ultrastructural changes of embryos in wheat infected with storage fungi. **Plant Physiology**, v. 46, p. 857-859, 1970.
- ANSELME, C.; CHAMPION, R. Bean anthracnose. **ISTA handbook on seed health testing**. França: La Miniere. v. 45, p. 1-4, 1981.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigour testing handbook**. 1983. 93p. (AOSA. Handbook on seed testing. Contribution, 32).
- BARBOZA, M. M. S. Influência da umidade da semente de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) sobre a precisão do teste de envelhecimento precoce. Pelotas, 1981. 71p. (Dissertação)-Universidade Federal de Pelotas.
- BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science & Technology**, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.
- BERJAK, P.; VILLIERS, T. A. Ageing in plant embryos. II. Age-induced damage and its repair during early germination. **New Phytology**, v. 71, p. 135-144, 1972 a.
- BERJAK, P.; VILLIERS, T. A. Ageing in plant embryos. III. Acceleration of senescence following artificial ageing treatment. **New Phytology**, v. 71, p. 513-518, 1972 b.
- BEWLEY, J. D. Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. In: McDONALD Jr., M.

- B.; NELSON. C. J. (Ed.). **Physiology of seed deterioration**, Madison, Wisconsin, EUA: Crop Science Society of America, 1986. cap. 2, p. 27-45.
- BOARO, C. S. F.; CARVALHO, V. L. M. de; BICUDO, L. R. F.; NAKAGAWA, J. Estudo de testes em laboratório para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 6, n. 2, p. 77-86, 1984.
- BOLKAN, H. A. Las pudriciones radicales. In: SCHWARTZ, H. F.; GÁLVEZ, G. E. (Ed.). **Problemas de producción del frijol**: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Cali, CIAT, 1980. cap. 5, p. 65-99.
- BOLKAN, H. A.; SILVA, A. R.; CUPERTINO, F. P. Fungi associated with soybean and bean seeds and their control in Central Brasil. **Plant Disease Reporter**, v. 60, n. 6, p. 545-548, 1976.
- BOLKAN H. A.; WENHAM, H. T.; MILNE, K. S. Effect of soil temperature on severity of *Rhizoctonia solani* infection on potato shoots. **Plant Disease Reporter**, v. 58, n. 7, p. 646-649, 1974.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- BULISANI, E. A.; ALMEIDA, L. D. A. L; ROSTON, A. J. A cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. In : BULISANI, E. A. (Coord.). **Feijão**: fatores de produção e qualidade. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap. 2, p. 67-77.

- BYRD, H. W.; DELOUCHE, J. C. Deterioration of soybean seed in storage. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v. 61, p. 41-57, 1971.
- CHAUHAN, K. P. S.; PURKAR, J. K.; BANERJEE, S. K. Ageing induced changes in seeds. **Seed Research**, v. 12, n. 1, p. 53-71, 1984.
- CHING, T. M. Aging stresses on physiological and biochemical activities of crimson clover (*Trifolium incarnatum* L. var. Dixie) seeds. **Crop Science**, v. 12, p. 415-418, 1972.
- CHING, T. M. Adenosine triphosphate content and seed vigor. **Plant Physiology**, v. 51, p. 400-402, 1973.
- CHING, T. M.; SCHOOLCRAFT, I. Physiological and chemical differences in aged seeds. **Crop Science**, v. 8, p. 407-409, 1968.
- CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. Microflora. In: CHRISTENSEN, C. M. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, 1974. cap. 4, p. 158-192.
- COSTA, A. S. Investigações sobre moléstias do feijoeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1., Campinas, 1971. **Anais**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1972. p. 305-384.
- DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.

- DHINGRA, O. D. Internally seedborne *Fusarium semitectum* and *Phomopsis* sp. affecting dry and snap bean seed quality. **Plant Disease Reporter**, v. 62, n. 6, p. 509-512, 1978.
- DHINGRA, O. D. Prejuízos causados por microorganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 7, n. 1, p. 139-145, 1985.
- DHINGRA, O. D.; NICHOLSON, J. F.; SINCLAIR, J. B. Influence of temperature on recovery of *Aspergillus flavus* from soybean seed. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 2, p. 185-187, 1973.
- DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J. J.; CRUZ FILHO, J. **Tratamento de sementes: controle de patógenos**. Viçosa: Imprensa Universitária. 1980. 121 p.
- DONGO, S. L.; MULLER, L. E. Pathogenecity studies of *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli* in beans. **Turrialba**, v. 19, n. 2, p. 82-90, 1969.
- ELLIS, M. A.; GALVÉZ, G. E. Patología de la semilla. In: SCHWARTZ, H. F.; GÁLVEZ, G. E. (Ed.). **Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali, CIAT, 1980. cap. 16, p. 301-314.
- ELLIS, M. A.; ILYAS, M. B.; SINCLAIR, J. B. Effect of cultivar and growing region on internally seedborne fungi and *Aspergillus melleus* pathogenicity in soybean. **Plant Disease Reporter**, v. 58, n. 4, p. 332-334, 1974.

ELLIS, M. A.; GÁLVEZ, G. E.; SINCLAIR, J. B. Effect of pod contact with soil on fungal infection of dry bean seeds. **Plant Disease Reporter**, v. 60, n. 11, p. 974-976, 1976.

FIELDS, R. W.; KING, T. H. Influence of storage fungi on deterioration of stored pea seed. **Phytopathology**, v. 52, p. 336-339, 1962.

FILGUEIRAS, T. S. Seed vigor and productivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 16, n. 6, p. 851-854, 1981.

FRANÇA NETO, J. B.; PEREIRA, L. A. G.; COSTA, N. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1988. 58 p.

FURLAN, S. H. Efeito de regiões e épocas de produção na qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de São Paulo. Piracicaba, 1986. 130 p. (Dissertação)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P. C. T.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. N.; SALGADO, C. L. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas e seu controle**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1968. 640 p.

GANGULI, S; SEN-MANDI, S. Some physiological differences between naturally and artificially aged wheat seeds. **Seed Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 507-514, 1990.

- HALLOIN, J. M. Postharvest infection of cottonseed by *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 65, p. 1229-1232, 1975.
- HARMAN, G. E.; NASH, G. Deterioration of stored pea seed by *Aspergillus ruber*: evidence for involvement of a toxin. **Phytopathology**, v. 62, p. 209-212, 1972.
- HARMAN, G. E.; NEDROW, B. L.; CLARK, B. E.; MATTICK, L. R. Association of volatile aldehyde production during germination with poor soybean and pea seed quality. **Crop Science**, v. 22, p. 712-716, 1982.
- HEGDE, D. G.; HIREMATH, R. V. Seed mycoflora of cowpea and its control by fungicides. **Seed Research**, v. 15, n. 1, p. 60-65, 1987.
- HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. B.; COSTA, N. P. Contaminação superficial de sementes de soja por *Aspergillus* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 4., Brasília, 1985. **Resumo dos trabalhos técnicos**. Brasília: ABRATES, 1985. p. 137.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y. J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, v. 3, p. 881-888, 1975.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ; ASSOCIAÇÃO DE CRÉDITO E ASSISTÊNCIA RURAL DO PARANÁ. Estudo comparativo de sementes de feijão. Mimeografado. Circ. Rest. 1979. 25p.
- JAMES, D. F. Vigor deterioration in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) after accelerated aging. Florida, 1982. 155p. Thesis (Doctor)-The University

of Florida. Resumo DA 8226398 em **Dissertation Abstracts International**, v. 43, n. 6, p. 1685-B, Dec. 1982.

KABEERE, F.; TALIGoola, H. K. Microflora and deterioration of soybean seeds in Uganda. **Seed Science and Technology**, v. 11, p. 381-392, 1983.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F.(Ed.). **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1980. v. 2, cap. 19, p. 297-318.

KONONKOV, P. F.; DUDINA, Z. N. Fungi on vegetable crop seeds stored in conditions of high relative humidity and temperature. **Seed Science & Tecnology**, v. 14, p. 675-684, 1986.

KRZYZANOWSKI, F. C., FRANÇA NETO, J. B., HENNING, A. A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, v.1, n. 2, p. 15-59, 1991.

KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, J. D.; SCOTTI, C. A.; SILVEIRA, J. F. O envelhecimento precoce na avaliação de lotes de sementes de feijoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 4, n. 1, p. 45-58, 1982.

KULIK, M. M.; YAKLICH, R. W. Evaluation of vigor tests in soybean seeds: relationship of accelerated aging, cold, sand bench, and speed of germination tests to field performance. **Crop. Science**, v. 22, n. 4, p. 766-770, 1982.

LASCA, C. C. Fungos de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 9., Campinas, 1976.

Resumo de trabalhos. Campinas: Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1976. v. 9, p. 20-21.

LIMA, E. F.; CARVALHO, L. P.; CARVALHO, J. M. F. C. Comparação de métodos de análise sanitária e ocorrência de fungos em sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, p. 401-406, 1982.

LIMA, E. F.; VIEIRA, R. M.; CARVALHO, J. M. F. C. Influência de *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger* e *A. flavus* na deterioração de sementes de algodoeiro armazenadas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 555-560, 1984.

LIN, S. S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n. 2, p.1-6, 1990.

LÓPEZ, L. C.; CHRISTENSEN, C. M. Effect of moisture content and temperature on invasion of stored corn by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 57, p. 588-590, 1967.

LUCCA FILHO, O. A. Importância da sanidade na produção de sementes de alta qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 7, n. 1, p. 113-123, 1985.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações.** Brasília: MEC- ESAL- FAEPE, 1988. 107p.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes.** Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 133-149.

MARCOS FILHO, J.; VINHA, J. L. Teor de umidade da semente, condições de armazenamento e comportamento da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no teste de envelhecimento rápido. **O Solo**, v. 72, n. 1, p. 21-26, 1980.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARCOS FILHO, J.; FONSECA, M. C. B.; MAZZOTTI, M. A. Teor de umidade da semente, e comportamento da soja, no teste de envelhecimento rápido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 11-16, 1978.

MARCOS FILHO, J.; AMORIM, H. V.; SILVAROLLA, M. B.; PESCARIN, H. M. C. Relações entre germinação, vigor e permeabilidade das membranas celulares durante a maturação de sementes de soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., Brasília, 1981. **Anais**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1982. p. 676-688.

MARCOS FILHO, J.; PESCARIN, H. M. C.; KOMATSU, Y. H.; DEMÉTRIO, C. G. B.; FANCELLI, A. L. Testes para avaliação do vigor de sementes de soja e suas relações com a emergência das plântulas em campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 5, p. 605-613, 1984.

MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook on Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 89-94, 1985.

McDONALD, M. B.; GUPTA, I. J.; SCHMITTHENNER, A. F. Effect of storage fungi on seed vigour of soybean. **Seed Science and Technology**, v. 21, p. 581-591, 1993.

- McDONALD Jr., M. B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v. 65, p. 109-139, 1975.
- McDONALD Jr., M. B. The influence of seed moisture on the accelerated aging seed vigor test. **Journal of Seed Techonolgy**, v. 2, n. 1, p. 18-28, 1977.
- MEDINA, P. F.; RAZERA, L. F.; MARCOS FILHO, J. Avaliação da qualidade de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) envelhecidas artificialmente através de testes de tetrazólio e condutividade elétrica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 8., Fóz do Iguaçu, 1993. **Resumo dos trabalhos técnicos**. Londrina: Informativo ABRATES, 1993. v. 3, n. 3, p. 140.
- MENEZES, J. R. de. Diagnóstico da patologia de semente de feijão no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 7, n. 1, p. 49-53, 1985.
- MENTEN, J. O. M. Sanidade, germinação e vigor de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) **Summa Phytopathologica**, v. 4, n. 2/4, p. 105-110, 1978.
- MONDRAGON, R. L.; POTTS, H. C. Field deterioration of soybeans as affected by environment. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v. 64, p. 63-71, 1974.
- MULLET, J. H.; CONSIDINE, J. A. Potassium release and uptake in germinating legume seeds in relation to seed condition and germination environment. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, n. 120, p. 151-162, 1980.

- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 59-65.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2. ed. London: MacMillan Press Ltd, 1979. v. 1, 839p.
- NOBLE, M.; RICHARDSON, M. J. An annotated list of seed borne diseases. **Proceedings the International Seed Testing Association**, v. 33, p. 1-191, 1968.
- NOVEMBRE, A. D. L. C.; MARCOS FILHO, J. Tratamento fungicida e conservação de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 13, n. 2, p. 105-113, 1991.
- OLIVEIRA, S. M. A. de. Transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn) Scribner por sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e seu controle através de tratamento químico e biológico. Piracicaba, 1991. 72p. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PANDEY, D. K. Priming induced repair in French bean seeds. **Seed Science & Technology**, v. 16, p. 527-532, 1988.
- PANDEY, D. K. Priming induced alleviation of the effects of natural ageing derived selective leakage of constituents in French bean seeds. **Seed Science & Technology**, v. 17, n. 1, p. 391-397, 1989.

- PARRISH, D. J.; LEOPOLD, A. C. On the mechanism of aging in soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 61, n. 3, p. 365-368, 1978.
- PATRICIO, F. R. A.; BORIN, R. B. R. G.; ORTOLANI, D. B. Patógenos associados a sementes que reduzem a germinação e vigor. In: MENTEN, J.O.M. (Ed.). **Patógenos em sementes; detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: FEALQ. 1991. cap. 3, p. 137-160.
- PEARCE, R. S.; ABDEL SAMAD, I. M. Change in fatty acid content of polar lipids during ageing of seeds of peanut (*Arachis hypogea* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 31, n. 124, p. 1283-1290, 1980.
- PEREIRA, O. A. P. A patologia de sementes no contexto da indústria brasileira de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 1., Piracicaba, 1984. **Anais**. Piracicaba: ABRATES, 1984. p. 30-32.
- PHIPPS, P. M. Soybean and peanut seed treatment: new developments and needs. **Plant Disease**, v. 68, n. 1, p. 76-77, 1984.
- POTTS, H. C.; DUANGPATRA, J.; HAIRSTON, W. G.; DELOUCHE, J. C. Some influences of hardseededness on soybean seed quality. **Crop Science**, v. 18, p. 221-224, 1978.
- PRIESTLEY, D. A.; LEOPOLD, A. C. Lipid changes during natural aging of soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 59, p. 467-470, 1983.

- PURKAR, J. K., MEHRA, R. B.; BANERJEE, S. K. Seed ageing induced variability in quantitative characters of pea and wheat. 19 th ISTA Congress, Vienna, Preprint 60, 1980.
- RAVA, C. A.; VIEIRA, E. H. N.; COSTA, J. G. C.; SILVEIRA, P. M. Obtenção de germoplasma de feijão livre de patógenos transmissíveis pela semente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 3, n. 3, p. 135-146, 1981.
- RICHARDSON, M. J. **Supplement 1 to An annotated list of seed borne diseases**. 3.ed. Zurich: ISTA, 1981. 78 p.
- ROBERTS, E. H. Cytological, genetical and metabolic changes associated with loss of viability. In: ROBERTS, E. H. (Ed.). **Viability of seed**. London: Chapman and Hall Ltd, 1972. cap. 9, p. 253-306.
- ROBERTS, E. H. Loss of seed viability: chromosomal and genetic aspects. **Seed Science & Technology**, v. 1, n. 3, p. 515-527, 1973.
- SAHARAN, G. S.; GUPTA, V. K. Influence of *Aspergilli* on soybean seeds in storage. **Phytopathology Z**, v. 78, p. 141-146, 1973.
- SANDERS, J. H.; SCHWARTZ, H. F. La producción de frijol y limitaciones impuestas por las plagas en América Latina. In: SCHWARTZ, H. F.; GÁLVEZ, G. E. (Ed.). **Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980. cap. 1, p. 1-14.

- SCHWARTZ, H. F. Diversos patógenos fúngicos. In: SCHWARTZ, H.F.; GÁLVEZ G. E. (Ed.). **Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980. cap. 8, p. 127-151.
- SHARMA, J. P.; GUPTA, J. S. Studies on stored seed mycoflora of moth bean and effect of their filtrates on germination and seedling vigour. **Seed Research**, v. 8, n. 2, p. 163-166, 1980.
- SIMON, E. W. Phospholipids and plant membrane permeability. **New Phytology**, v. 73, p. 377-420, 1974.
- TANAKA, M. A. S.; CORRÊA, M. U. Influência de *Aspergillus* e *Penicillium* no armazenamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 451-456, 1981.
- TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 122, p. 40-46, 1985.
- TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANNO, M. I. A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopatologica**, v. 15, p. 232-237, 1989.
- TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B.; PHILLIPS, A. D. Effect of field weathering on the viability and vigor of soybean seed. **Agronomy Journal**, v. 72, p. 749-753, 1980.

TERVET, I. W. The influence of fungi on storage, on seed viability and seedling vigor of soybeans. **Phytopathology**, v. 35, p. 3-15, 1945.

TESTE de sanidade das sementes das regras para análise de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 1., Piracicaba, 1988. Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 43-62.

TILDEN, R. L.; WEST, S. H. Reversal of the effects of aging in soybean seeds **Plant Physiology**, v. 77, p. 584-586, 1985.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 231 p.

VIEIRA, R. F.; SARTORATO, A. **Recomendações técnicas para produção de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) de alta qualidade**. Goiânia: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, 1984. 46p. (EMBRAPA, CNPAF. Circular Técnica, 10).

WOODSTOCK, L. W. Physiological and biochemical tests for seed vigor. **Seed Science & Technology**, v. 1, n. 1, p. 127-157, 1973.

WU, W-S.; CHENG, K-C. Relationships between seed health, seed vigour and the performance of sorghum in the field. **Seed Science & Technology**, v. 18, p. 713-719, 1990.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Doenças do feijoeiro e seu controle. **Informe Agropecuário**, v. 4, n. 46, p. 50-63, 1978.