

Métodos de Desinfestação Superficial para Obtenção de Sementes de Milho Livres de Microrganismos



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Membros

Diretoria Executiva

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Agrobiologia

José Ivo Baldani
Chefe Geral

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Rosângela Stralio
Chefe Adjunto Administrativo

4. Referências Bibliográficas

ABIMILHO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 10 jan. 2004.

BALDANI, V. L. D. **Especificidade na infecção de raízes de milho, trigo e arroz por *Azospirillum* spp.** 1980. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação in vitro. **ABCTP Notícias**, Brasília, DF, n. 36, p. 5-10, 2000.

PINHEIRO, R. O. **Estudo da adesão de *Azospirillum* spp. às raízes de trigo.** 1992. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1517-8498

Junho/2006

Documentos 212

Métodos de Desinfestação Superficial para
Obtenção de Sementes de Milho Livres de
Microrganismos

Marcela Motta Drechsel
Vera Lúcia Divan Baldani

Seropédica – RJ
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Jean Luiz Simões Araújo e Rosa Maria Pitard

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2006): 50 exemplares

D771m Dreschel, Marcela Motta

Métodos de desinfestação superficial para obtenção de sementes de milho livres de microrganismos / Vera Lúcia Divan Baldani. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 212).

ISSN 1517-8498

1. Milho. 2. Microrganismo. I. Baldani, Vera Lúcia Divan, colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 584.92

© Embrapa 2006



Figura 10: Desinfestação das sementes do híbrido SHS 50-50 (com e sem fungicida) e do cultivar BRS 4150 pré-germinadas em meio batata no método de emissão do raio ultravioleta por uma hora

3. Conclusões

- ✓ método de imersão em H₂O₂ foi mais eficiente para as sementes tratadas com fungicida desinfestando superficialmente as sementes dos cultivares BR 4150, BR106 e do híbrido SHS 50-50 (com fungicida).
- ✓ A emissão do raio ultravioleta desinfestou as sementes do híbrido SHS 50-50 (com e sem fungicida) e as do cultivar BRS 4150.
- ✓ método de imersão em hipoclorito acidificado foi mais eficiente para as sementes sem fungicida, desinfestando sem prejudicar a germinação das sementes do cultivar BR 473 e Eldorad.
- ✓ Não houve nenhum método que tivesse obtido resultados satisfatórios na desinfestação das sementes do cultivar Sol da manhã e Saracura.
- ✓ Os demais métodos inibiram a germinação das sementes.



Figura 8: Verificação de desinfestação na germinação das sementes em meio batata no método de tratamento térmico.

A exposição das sementes ao raio ultravioleta durante 1 hora desinfestaram as sementes do híbrido SHS 50-50 (com e sem fungicida e o cultivar BRS 4150 (Figuras 9 e 10). Entretanto esses resultados não foram observados nas cultivares BR106, BR473, Eldorado, Sol da Manhã e Saracura (figura 9).



Figura 9: Verificação de desinfestação na germinação das sementes em meio batata no método de emissão do raio ultravioleta por uma hora.

Autores

Marcela Motta Drechsel

Bióloga, MSc. em Biotecnologia Vegetal, Estagiária da Embrapa Agrobiologia
BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ
e-mail: marceladrechsel@yahoo.com.br

Vera Lúcia Divan Baldani

Licenciada em Ciências Agrícolas, PhD em Ciência do Solo, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia
BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ
e-mail: vera@cnpab.embrapa.br



Figura 6: Verificação de desinfestação na germinação das sementes em meio batata no método de calor seco a 100°C durante 24 horas.



Figura 7: Verificação de desinfestação na germinação das sementes em meio batata no método de calor seco a 100°C durante 72 horas

térmico (figura 8) inibiram completamente a germinação das sementes. Conforme os dados apresentados nos resultados, pode-se verificar que a eficiência de cada método varia conforme a variedade da semente e a presença de fungicida.



Figura 4: Efeito da desinfestação na germinação das sementes em meio batata no método de etanol durante 30 minutos.



Figura 5: Efeito da desinfestação na Germinação das sementes em meio batata no método de etanol durante 1 hora.

Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

O documento 212/2006 aborda a avaliação de métodos de desinfestação superficial de sementes de milho visando a obtenção de sementes livres de microrganismos. Sementes livres de microrganismos são importantes em estudos conduzidos em laboratórios onde se pretende avaliar o efeito de bactérias benéficas, como por exemplo as diazotróficas, no desenvolvimento das plantas. Neste estudo foram avaliados 6 métodos de desinfestação em diferentes variedades de milho cujos resultados mostraram que a eficiência do método varia com a variedade de milho e com a presença de fungicida nas sementes. Alguns métodos promoveram inclusive a inibição da germinação das sementes. Portanto, deve-se realizar experimentos prévios para determinar o melhor método de desinfestação de sementes de milho.

José Ivo Baldani
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. Resultados de Pesquisa.....	8
2.1. Método 1 – Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) (MONTARROYOS, 2000).....	8
2.2. Método 2 – Hipoclorito Acidificado (PINHEIRO, 1992).....	8
2.3. Método 3 – Etanol Absoluto	9
2.4. Método 4 – Calor Seco	9
2.5. Método 5 – Tratamento térmico	9
2.6. Método 6 – Exposição à radiação ultravioleta	9
3. Conclusão	20
4. Referências Bibliográficas	21



Figura 2: Efeito da desinfestação na germinação em meio batata das sementes dos cultivares BRS4150, BR 106 e SHS 5050 com fungicida) no método de peróxido de hidrogênio

Com o uso do método de imersão em hipoclorito acidificado houve a desinfestação de pelo menos 90% das sementes dos cultivares BR 473 e Eldorado, sem fungicida (Figura 3).



Figura 3: Efeito da desinfestação na germinação em meio batata das sementes do cultivar BR 473 e Eldorado (sem fungicida) no método de hipoclorito acidificado

Já as sementes testadas pelos métodos de imersão em etanol 30 minutos e 1 hora (figuras 4 e 5, respectivamente) e o de calor seco (24 e 72 horas) (figuras 6 e 7 respectivamente) e o tratamento

objetivo de se observar o efeito dos métodos sobre seu índice de germinação e seu grau de contaminação, sendo incubadas por 5 dias a temperatura de 30°C. As sementes que não apresentaram contaminação, tiveram seus métodos repetidos, contendo 10 sementes de cada cultivar por placa de meio batata.

A avaliação do tratamento controle (sementes que não sofreram o processo de desinfestação mostrou a redução da germinação em 25% no cultivar Eldorado e em 20% no cultivar Sol da manhã. Tal redução pode ser devido ao fato destas sementes apresentarem maior quantidade de fungos quando germinada do que as outras cultivares, podendo estes fungos terem causado a diminuição do índice de germinação. No híbrido SHS 50-50 (com fungicida) houve redução de 20% da germinação e nas demais variedades a germinação foi de 100% (Gráfico 1). Verificou-se que o milho híbrido foi o mais resistente em relação a eliminação à quantidade de microrganismos presentes em suas sementes do que os cultivares. A eficácia dos métodos de desinfestação variam de acordo com a variedade de milho e seu respectivo método de desinfestação (concentração e o tempo de imersão). A imersão em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 20 e 30 minutos, desinfestou as sementes do cultivar BRS 4150; sendo que em 30 minutos também houve a desinfestação do híbrido SHS 50-50 (com fungicida) e do cultivar BR 106 (Figura 1 e 2).

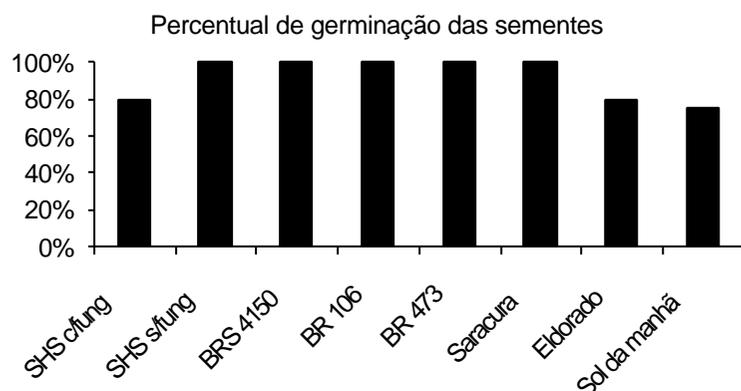


Figura 1 : Percentual de germinação das sementes de diversos cultivares de milho em placas contendo o meio batata (10 sementes por placa).

Métodos de Desinfestação Superficial para Obtenção de Sementes de Milho Livres de Microrganismos

Marcela Motta Drechsel
Vera Lúcia Divan Baldani

1. Introdução

O milho, (*Zea mays*), é o terceiro cereal mais utilizado na alimentação humana, apenas perdendo para o arroz e o trigo. Esta elevada produção em massa reflete sua importância sócio-econômica porque é utilizado para diversas finalidades, tanto na alimentação humana e de animais, quanto nos seus produtos industrializados, gerando, conseqüentemente, milhares de empregos (ABIMILHO, 2004)

O nitrogênio, um dos principais nutrientes de várias plantas e também do milho pode ser adquirido pelo solo, fixação biológica de nitrogênio (FBN) e fontes químicas como fertilizantes nitrogenados. Este elemento tão importante pode ser perdido por processos de lixiviação, desnitrificação e etc. Atualmente, uma forma de se obter a fertilização nitrogenada é através da FBN (BALDANI, 1980)

Para estudar e observar o comportamento das bactérias dizotróficas, seria preciso a retirada das demais bactérias não fixadoras das sementes do milho, para que não haja nenhuma interferência na interação das bactérias fixadoras. Como até hoje nenhum estudo sobre este processo obteve resultados satisfatórios, a finalidade deste trabalho foi conseguir um método de desinfestação realmente eficiente para facilitar os estudos do processo de colonização e infecção dessas bactérias diazotróficas, nas raízes de milho e para produção futura de um veículo eficaz de inoculação com essas bactérias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de diversas técnicas de desinfestação superficial para a obtenção de sementes de milho livres de microrganismos.

2. Resultados de Pesquisa

O experimento consistiu em um teste prévio para verificar a germinação das sementes antes e após os tratamentos de desinfestação. O poder germinativo e a presença de contaminantes nas sementes foram testados em placas, contendo meio rico (batata), incubadas por 5 dias à temperatura de 30°C. Foram testadas sementes de milho dos híbridos SHS 50-50 (com e sem fungicida Captan e Vetran) oriundos da fazenda Sta Helena, e das variedades produzidas pela Embrapa: BR473, Eldorado, Saracura e Sol da manhã (sem fungicida), BR 106 e BRS4150 (com fungicida). Os tratamentos de desinfestação utilizados foram: imersão em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 10, 20 e 30 minutos; em hipoclorito acidificado; etanol absoluto em 30 minutos e em 1 hora; calor seco a 100° C durante 24 e 72 horas; tratamento térmico em água e emissão de raios ultravioletas durante 1 hora. Em todos os métodos utilizados (após a desinfestação) as sementes foram lavadas por 10 vezes em água estéril por 3 minutos cada, permanecendo na última água de lavagem por 4 horas para facilitar a germinação.

2.1. Método 1 – Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) (MONTARROYOS, 2000)

Imersão das sementes em H₂O₂ (H₂O₂ – 30% O₂ 100 vol.) durante 10, 20 e 30 minutos sob agitação de 100 rpm.

2.2. Método 2 – Hipoclorito Acidificado (PINHEIRO, 1992)

Imersão das sementes em etanol (95%) por 90 segundos sob agitação de 100 rpm, imergindo posteriormente durante 15 minutos em hipoclorito acidificado*; fazendo 4 lavagens sucessivas de 3 minutos cada com água destilada estéril, mais uma vez postas em hipoclorito acidificado, fazendo 3 lavagens de 3 minutos cada em água destilada estéril. Logo após, as sementes foram imersas em peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – 30% O₂ 100 vol.) durante 15 minutos.

Hipoclorito Acidificado (solução):

Solução A: 5% NaOCl (água sanitária)

Solução B: 160 ml de KH₂PO₄; 40 ml de HCL concentrado; 250 ml de água destilada

Solução C: 1% V/V tween 80

Solução Final: 20 ml da solução A + 2 ml da solução C + 4 ml da solução B + 174 ml de água destilada estéril.

2.3. Método 3 – Etanol Absoluto

Imersão em etanol absoluto durante 30 e 60 minutos sob agitação de 100 rpm.

2.4. Método 4 – Calor Seco

As sementes foram submetidas à temperatura de 100°C na estufa durante 24 e 72 horas, lavadas e postas para pré-germinar a 30°C.

2.5. Método 5 – Tratamento térmico

Imersão das sementes em água por 1 hora a 55°C, acrescido de 6 minutos a 70°C, 4 minutos a 75°C e 3 minutos a 80°C.

2.6. Método 6 – Exposição à radiação ultravioleta

As sementes nas placas contendo meio sólido rico (batata) foram expostas à radiação ultravioleta durante 1 hora na capela de fluxo laminar.

Os métodos testados consistiram na imersão das sementes em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 10, 20 e 30 minutos; em hipoclorito acidificado durante 30 minutos; em etanol absoluto, durante 30 minutos e 1 hora; calor seco a 100°C durante 24 e 72 horas; tratamento térmico em água e exposição aos raios ultravioleta durante 1 hora. Após serem submetidas aos diversos métodos de desinfestação, 4 sementes de cada cultivar foram postas para pré-germinar em placas contendo meio batata, com o