

Protocolo – “Blotter test”

- **Número ideal de sementes para análise:** 400 sementes
- **Procedimentos:** As sementes devem ser dispostas equidistantes sobre tripla camada de papel de filtro umedecido, no interior de recipientes com tampas transparentes para a passagem de luz, como placas de petri, gerboxes ou equivalentes.
- **Condições de Incubação:** Os recipientes contendo as sementes devem ser dispostos sob lâmpadas de luz fluorescente branca, em câmaras com fotoperíodo de 12 horas pelo período de 7 a 8 dias a temperatura de 20+/- 2°C.
- **Avaliação/Exame das Sementes:** As sementes são examinadas individualmente através de um microscópio estereoscópio. Conidióforos com conídios e corpos de frutificação (e.g., picnídios, acérvulos, peritécios), estruturas típicas de fungos, formados nas sementes são características importantes para identificar as espécies fúngicas. Se necessário, deve-se observar lâminas ao microscópio ótico para confirmar a identidade dos fungos em nível de espécie. Os resultados devem ser expressos em percentual de ocorrência dos fungos.
- **Observações:**

O teste é, normalmente, utilizado para sementes não desinfestadas. Caso a desinfestação seja necessária, deve ser feita com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos.

A redução do processo de germinação das sementes de espécies de dicotiledôneas, durante o período de incubação, é realizada através do umedecimento do substrato de papel em solução 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato de sódio) a 5ppm de concentração. Para monocotiledôneas e algumas dicotiledôneas com sementes menores, pode-se utilizar a técnica do congelamento em substituição ao 2,4-D. Neste caso, os recipientes com as sementes devem ser incubados por 24 horas sob temperatura de 20 +/- 2°C, em seguida em congelador (-20°C) por 24 horas, e finalmente retornados a incubadora a 20+/-2°C sob luz fluorescente branca por mais 5 dias.

Em caso de sementes arredondadas, recomenda-se realizar pequenas cavidades no substrato de papel para prevenir que estas movimentem-se durante a manipulação dos recipientes. Outra opção é a incorporação de 0,2% de agar a água utilizada para umedecer o papel.

Para sementes tratadas com fungicidas o período de incubação deve ser prolongado por mais três dias.