

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**ESTUDO DA GERMINAÇÃO E DO EFEITO DE
Trichoderma spp. NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
DE *Gochnatia polymorpha* (LESS.) CABRERA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniele Franco Martins Machado

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**ESTUDO DA GERMINAÇÃO E DO EFEITO DE
Trichoderma spp. NO CRESCIMENTO DE
Gochnatia polymorpha (LESS.) CABRERA**

Daniele Franco Martins Machado

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, área de Concentração em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia.**

Orientador: Prof. Antonio Carlos Ferreira da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2012

M149e Machado, Daniele Franco Martins
Estudo da germinação e do efeito de *Trichoderma* spp. na promoção do
Crescimento de *Gochnatia polymorpha* (Less.) cabrera / Daniele Franco Martins
Machado. – 2012.
99 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Antonio Carlos Ferreira da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS,
2012

1. Mudas florestais – Produção e cultivo 2. Sementes – Germinação 3.
Espécies florestais 4. Espécies nativas 5. Interação planta-microorganismos
6. Fungos I. Silva, Antonio Carlos Ferreira da II. Título.

CDU 630*23

Ficha catalográfica elaborada por
Alenir Inácio Goularte – CRB 10/990
Biblioteca Central da UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado**

**ESTUDO DA GERMINAÇÃO E DO EFEITO DE *Trichoderma* spp. NO
CRESCIMENTO DE *Gochnatia polymorpha* (LESS.) CABRERA**

elaborada por
Daniele Franco Martins Machado

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Antonio Carlos Ferreira da Silva, Dr.
(Presidente/Orientador)

Solange Bosio Tedesco, Dra. (UFSM)

Luciana Zago Ethur, Dra. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012.

“... Dedico este trabalho a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho, em especial ao meu esposo e companheiro Roger Cavilhas Machado que esteve presente em todos os momentos...”

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter iluminado meu caminho e por permitir a realização de mais uma conquista na minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria, que oportunizou a realização desse sonho.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Antonio Carlos Ferreira da Silva, pela amizade, orientação e auxílio.

À professora Juçara Terezinha Paranhos e ao professor Sidinei José Lopes, pela co-orientação, atenção, ajuda e amizade. Ao professor Sidinei também pela ajuda nas análises estatísticas.

À professora Thais Scotti Canto-Dorow pela ajuda nas coletas e à professora Sônia Dequech, pelo incentivo para a minha participação no processo seletivo do mestrado.

Ao aluno de iniciação científica Antonio Padilha Tavares, companheiro em todos os experimentos e inúmeras avaliações, sua ajuda e disponibilidade foram inquestionáveis.

Aos colegas do Laboratório Interação Planta-Microrganismo, Anderson, Leandro e Fábio que, apesar do pouco convívio, cada um teve a sua participação.

Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

Às meninas do Laboratório de Citogenética Vegetal e à professora Solange Bosio Tedesco pelo pensamento positivo sempre.

Aos colegas e amigos de curso pela convivência e aprendizado.

À minha família, em especial a minha mãe Helena que esteve sempre rezando e torcendo por mim, à minha sobrinha Gabi pela torcida, apoio e incentivo, à minha afiliada Larissa pela sua alegria contagiante e à memória de meu pai Gomercindo.

À meu esposo Roger, presente nos momentos felizes e difíceis, pela sua compreensão, paciência, apoio e incentivo.

À todas as pessoas que, mesmo não mencionadas, contribuíram para a realização desse sonho.

Meu sincero, obrigada!

Se não houver frutos
Valeu pela beleza das flores

Se não houver flores
Valeu pela sombra das folhas

Se não houver folhas
Valeu pela intenção da semente...

(Henfil)

RESUMO GERAL

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DA GERMINAÇÃO E DO EFEITO DE *Trichoderma* spp. NO CRESCIMENTO DE *Gochnatia polymorpha* (LESS.) CABRERA

AUTORA: DANIELE FRANCO MARTINS MACHADO

ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS FERREIRA DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012.

A produção e cultivo de mudas florestais nativas possuem dificuldades que podem ser atendidas através do conhecimento dos fatores ambientais e dos microrganismos que afetam a germinação das sementes, assim como, da interação entre espécies florestais e *Trichoderma*, que é um gênero de fungos utilizado no controle biológico de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal. Este trabalho objetivou estudar a germinação das sementes de *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera, identificar os fungos associados aos diásporos e avaliar o efeito de *Trichoderma* spp. na promoção da germinação e do crescimento vegetal. No estudo da germinação das sementes, os diásporos foram submetidos às temperaturas de 15°, 20°, 25° e 30°C com fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo. Em outro experimento foi avaliado o efeito do hipoclorito de sódio (NaClO) na germinação das sementes e na contaminação dos diásporos com e sem papus, nas concentrações 0, 1, 2, 3 e 4%. A identificação dos fungos presentes nos diásporos foi realizada pelos métodos do papel de filtro e do plaqueamento em meio de cultura BDA. No estudo da interação entre *G. polymorpha* e *Trichoderma* spp. foram avaliados os isolados TSM1 e TSM2 de *Trichoderma viride*, 2B2 e 2B22 de *Trichoderma harzianum* e dois produtos comerciais, Agrotich[®] e Trichodermil[®], na contaminação dos diásporos e na germinação das sementes, através da técnica *in vitro* do papel celofane. O antagonismo de tais isolados a quatro fungos dos gêneros *Bipolaris*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Phoma*, previamente isolados dos diásporos, foi avaliado pela técnica de confrontação direta. Os experimentos de interação *ex vitro* foram realizados em casa de vegetação com substrato autoclavado e não autoclavado. Conclui-se que as sementes germinam tanto na presença quanto na ausência de luz, sendo que as temperaturas de 15° e 20°C são as mais adequadas. As concentrações de NaClO testadas não interferem na germinação das sementes, mas em diásporos com papus as menores médias de contaminação são nas concentrações 0% e 4%; já em diásporos sem papus, as menores médias são nas concentrações 3, 4 e 0%. Os gêneros fúngicos identificados nos diásporos são *Bipolaris*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Aspergillus* e *Epicoccum*. Com a técnica *in vitro* do papel celofane, todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados são eficientes no controle da contaminação dos diásporos, mas não é possível avaliar o efeito de *Trichoderma* spp. na germinação das sementes. Na técnica confrontação direta, o isolado 2B22 e o produto Agrotich[®] são os mais eficientes. Tanto em substrato autoclavado quanto em não autoclavado, os isolados testados não interferem na emergência das plântulas, mas os isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum* promovem o crescimento vegetativo de *G. polymorpha*.

Palavras-chave: Espécie florestal. Espécie nativa. Qualidade fisiológica. Qualidade sanitária. Interação planta-microrganismo.

ABSTRACT GENERAL

Master Science Dissertation
Program of Pos-Graduation in Agrobiolology
Federal University of Santa Maria

STUDY OF THE GERMINATION AND EFFECT OF *Trichoderma* spp. INTHE GROWTH OF *Gochnatia polymorpha* (LESS.) CABRERA

AUTHOR: DANIELE FRANCO MARTINS MACHADO

ADVISOR: ANTONIO CARLOS FERREIRA DA SILVA

Date and Location of Defense: Santa Maria, February 24, 2012.

The production and cultivation of native tree seedlings have difficulties that can be attended to through the knowledge of the environmental factors and microorganisms affecting seed germination, as well as the interaction between forest species and the *Trichoderma*, which is a genus of fungi used in plant pathogens biological control and promotion of plant growth. This study aimed to investigate the germination of *Gochnatia polymorpha* (Less.)Cabrera, identifying the fungi associated with diaspores and evaluate the effect of *Trichoderma* spp. in promoting germination and plant growth. In the study of seed germination, the seeds have been subjected to temperatures of 15°, 20°, 25° and 30° C with a photoperiod of 16 hours and continuous darkness. In another experiment the effect of sodium hypochlorite (NaClO) has been evaluated on seed germination and contamination of the seeds with and without Papus at concentrations of 0, 1, 2, 3 and 4%. Identification of fungi present in the diaspores has been performed by the methods of filter paper and plating on BDA culture medium. In the study of the interaction between *G. polymorpha* and *Trichoderma* spp. TSM1 and TSM2 isolates of *Trichoderma viride*, 2B2 and 2B22 of *Trichoderma harzianum* and two commercial products, Agrotrich® and Trichodermil®, have been analyzed in the contamination of and germination of the seeds, using the cellophane *in vitro* technique .The antagonism of these isolates to four fungi of the genera *Bipolaris*, *Alternaria*, *Cladosporium* and *Phoma*, previously isolated from diaspores, has been evaluated by the technique of direct confrontation. The *ex vitro* interaction experiments have been conducted in a greenhouse with autoclaved and not autoclaved substrates. It has been concluded that the seeds germinated both in the presence and absence of light and temperatures of 15° and 20° C have been the most appropriate. The tested concentrations of NaClO did not interfere with seed germination, but in diaspores with papus the lowest contamination rates have been in the concentrations of 0% and 4%; yet in the diaspores without papus, the lowest rates have been in the concentrations of 3, 4 and 0%. In the diaspores the fungi genera *Bipolaris*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Aspergillus* and *Epicoccum* have been identified. By the technique of *in vitro* cellophane, all tested isolates of *Trichoderma* spp. have been effective in controlling the contamination of the seeds, but it has been not possible to assess the effect of *Trichoderma* spp. in seed germination. In direct confrontation technique, the 2B22 isolate and the product Agrotrich ® have been the most effective. In both autoclaved and not autoclaved substrates, the tested isolates did not interfere in seedling emergence, but the isolates of 2B2 and 2B22 of *T. harzianum* promoted the vegetative growth of *G. polymorpha*.

Key word: Forest species. Native species. Physiological quality. Health quality. Plant-microorganism interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Gochnatia polymorpha</i> : (A) vista geral; (B) ramo com botões florais e capítulos com flores abertas; (C) infrutescências; (D) frutos	16
Figura 2 – Mapa dos principais biomas brasileiros em sua distribuição original	18
Figura 3 – Mapa dos locais de ocorrência natural de <i>Gochnatia polymorpha</i> no Brasil ...	19
Figura 4 – Imagens microscópicas dos fungos patogênicos: (A) <i>Alternaria</i> sp.; (B) <i>Curvularia</i> sp.; (C) <i>Fusarium</i> sp.	28
Figura 5 – Imagens microscópicas dos fungos: (A) <i>Aspergillus</i> sp.; (B) <i>Penicillium</i> sp. ...	29
Figura 6 – (A) placa com meio de cultura coberto pelo papel celofane; (B) disco de micélio de trichoderma sobre o papel celofane com liberação de metabólitos não-voláteis; (C) diásporos de <i>Gochnatia polymorpha</i> inoculados após a retirada do papel celofane e dos discos de micélio	63
Figura 7 – (A) disco de micélio de <i>Alternaria</i> sp. em meio de cultura BDA; (B) a esquerda disco de micélio de <i>Phoma</i> sp. e a direita disco de <i>Trichoderma</i> sp.	65
Figura 8 – Preparo do pó biológico à base de trichoderma: (A) discos de micélio e esporos em meio de aveia; (B) arroz autoclavado com os discos; (C) inóculo em envelope de papel seco na estufa; (D) inóculo a ser triturado no liquidificador; (E) inóculo de trichoderma na forma de pó biológico; (F) teste de viabilidade em diluições seriadas em meio BDA	66
Figura 9 – Experimento na casa de vegetação: (A) substrato não autoclavado; (B) substrato autoclavado	68
Figura 10 – Efeito de isolados de trichoderma na contaminação fúngica de diásporos de <i>Gochnatia polymorpha</i> pela técnica <i>in vitro</i> do papel celofane	70
Figura 11 – (A) confronto entre o isolado 2B22 de <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Alternaria</i> sp. aos oito dias; (B) confronto entre Agrotrich [®] e <i>Alternaria</i> sp. aos oito dias	73
Figura 12 – Diferenças no crescimento vegetal de <i>Gochnatia polymorpha</i> entre os isolados de trichoderma e o tratamento controle em substrato autoclavado. T1: TSM1 dose 1; T2: TSM1 dose 2; T3: TSM2 dose 1; T4: TSM2 dose 2; T5: 2B2 dose 1; T6: 2B2 dose 2; T7: 2B22 dose 1; T8: 2B22 dose 2; T9: mix dose 1; T10: mix dose 2; T11: Trichodermil [®] dose 1; T12: Agrotrich [®] dose 1; T13: controle (sem trichoderma)	83
Figura 13 – Diferenças no crescimento vegetal de <i>Gochnatia polymorpha</i> entre os isolados de trichoderma e o tratamento controle em substrato não autoclavado. T14: TSM1 dose 1; T15: TSM1 dose 2; T16: TSM2 dose 1; T17: TSM2 dose 2; T18: 2B2 dose 1; T19: 2B2 dose 2; T20: 2B22 dose 1; T21: 2B22 dose 2; T22: mix dose 1; T23: mix dose 2; T24: Trichodermil [®] dose 1; T25: Agrotrich [®] dose 1; T26: controle (sem trichoderma)	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tratamentos constituintes do experimento realizado pela técnica <i>in vitro</i> do papel celofane onde foi avaliado o efeito de trichoderma na contaminação dos diásporos e na germinação das sementes de <i>Gochnatia polymorpha</i>	64
Quadro 2 – Tratamentos constituintes do experimento <i>ex vitro</i> realizado em casa de vegetação onde foi avaliado o efeito de isolados de trichoderma na emergência das plântulas e no crescimento vegetativo de <i>Gochnatia polymorpha</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias do grau de umidade dos diásporos de <i>Gochnatia polymorpha</i> coletados em 2010 e 2011 no distrito Boca do Monte. Santa Maria – RS (2011)	43
Tabela 2 – Germinação das sementes de <i>Gochnatia polymorpha</i> em dois sistemas de cultivo, na presença e ausência de papus nos diásporos, coletados em janeiro de 2010. Santa Maria - RS (2011)	45
Tabela 3 – Germinação das sementes de <i>Gochnatia polymorpha</i> , submetidas a diferentes temperaturas. Santa Maria - RS (2011)	47
Tabela 4 – Primeira contagem de germinação das sementes de <i>Gochnatia polymorpha</i> , submetidas a diferentes temperaturas, na ausência e presença de luz. Santa Maria - RS (2011)	48
Tabela 5 – Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de contaminação por fungos dos diásporos de <i>Gochnatia polymorpha</i> , submetidos a diferentes temperaturas, na ausência e presença de luz. Santa Maria - RS (2011)	49
Tabela 6 – Germinação das sementes de <i>Gochnatia polymorpha</i> provenientes de diásporos com e sem papus, submetidos à assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO). Santa Maria - RS (2011)	52
Tabela 7 – Contaminação por fungos nos diásporos com e sem papus de <i>Gochnatia polymorpha</i> , submetidos à assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO). Santa Maria - RS (2011)	53
Tabela 8 – Fungos associados aos diásporos de <i>Gochnatia polymorpha</i> , detectados pelos métodos de papel de filtro e plaqueamento em meio de cultura BDA, na presença e ausência de papus, não submetidos à assepsia com NaClO 1% (S/A) e submetidos à assepsia (C/A). Santa Maria - RS (2011).....	55
Tabela 9 – Efeito dos isolados de trichoderma pela técnica <i>in vitro</i> do papel celofane em meio de cultura ágar-água + BD na contaminação dos diásporos e na germinação das sementes de <i>Gochnatia polymorpha</i> . Santa Maria - RS (2011)	71
Tabela 10 – Médias das notas de antagonismo de trichoderma aos fungos <i>Bipolaris</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. e <i>Phoma</i> sp. em pareamento de culturas. Santa Maria – RS (2011)	72
Tabela 11 – Primeira contagem de emergência (PC), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), sobrevivência de plântulas, número de folhas, altura de plântula, comprimento da maior raiz, massa fresca (MF) da parte aérea (PA) e da raiz e massa seca (MS) da parte aérea e da raiz de <i>Gochnatia polymorpha</i> por isolados de trichoderma em substrato autoclavado. Santa Maria - RS (2011)	75
Tabela 12 – Primeira contagem de emergência (PC), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), sobrevivência de plântulas, número de folhas, altura de plântula, comprimento da maior raiz, massa fresca (MF) da parte aérea (PA) e da raiz e massa seca (MS) da parte aérea e da raiz de <i>Gochnatia polymorpha</i> por isolados de trichoderma em substrato não autoclavado. Santa Maria - RS (2011)	80

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 A espécie arbórea <i>Gochnatia polymorpha</i> (Less.) Cabrera	15
1.1.1 Descrição sobre <i>G. polymorpha</i>	15
1.1.2 Importância de <i>G. polymorpha</i>	17
1.2 Situação atual das florestas brasileiras	18
1.3 Sementes florestais	21
1.3.1 Qualidade fisiológica de sementes	23
1.3.1.1 Temperatura e luz na qualidade fisiológica de sementes	24
1.3.2 Qualidade sanitária de sementes	27
1.4 Gênero <i>Trichoderma</i>	30
1.4.1 Mecanismos de ação de <i>Trichoderma</i>	31
1.4.1.1 Parasitismo	31
1.4.1.2 Antibiose	32
1.4.1.3 Competição	32
1.4.1.4 Indução de resistência	33
1.4.1.5 Promoção de crescimento vegetal	33
CAPÍTULO II - TEMPERATURA, LUZ E ASSEPSIA NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E SANIDADE DOS DIÁSPOROS DE <i>Gochnatia polymorpha</i> (LESS.) CABRERA	35
2.1 Introdução	36
2.2 Material e métodos	38
2.3 Resultados e discussão	43
2.4 Conclusões	58
CAPÍTULO III - <i>Trichoderma</i> spp. NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E NO CRESCIMENTO VEGETAL DE <i>Gochnatia polymorpha</i> (LESS.) CABRERA	59
3.1 Introdução	60
3.2 Material e métodos	61
3.3 Resultados e discussão	69
3.4 Conclusões	84
REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO GERAL

O mercado consumidor de sementes florestais nativas tem aumentado consideravelmente nos últimos 20 anos, devido ao crescente interesse econômico e mais recentemente pela preocupação conservacionista em recuperar áreas intensamente devastadas (FIGLIOLIA et al., 2007). No entanto, apesar da preocupação com a conservação ambiental, as florestas naturais continuam sofrendo a pressão da devastação, diante do avanço tecnológico e aumento da demanda por produtos florestais (ETTORI et al., 2006).

Uma alternativa para reduzir a exploração das florestas naturais; repor espécies arbóreas nativas na natureza; evitar a extinção destas espécies, assim como os fatores biológicos e ambientais decorrentes da degradação florestal; além de atender a demanda e com isso minimizar os custos com reflorestamento, é aumentar a oferta de sementes e mudas florestais com qualidade adequada. Segundo Silva e Higa (2006), a oferta de sementes e mudas de espécies florestais nativas é significativamente inferior à demanda atual e potencial, enquanto a relação das espécies recomendadas para restauração ambiental é ampla. Dentre elas está *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera, conhecida popularmente por cambará e pertencente à família Asteraceae (GLUFKE, 1999; JUNIOR et al., 2005).

Gochnatia polymorpha é uma árvore de pequeno porte, nativa e com distribuição em muitos estados brasileiros, dentre eles o Rio Grande do Sul. Apresenta madeira pesada, dura e compacta, própria para obras imersas, construção civil e moirões. A espécie também oferece características ornamentais e usos na medicina popular, sendo as folhas e cascas utilizadas na forma de chás como expectorante para afecções bronco-pulmonares (BACKES; IRGANG, 2002; CARVALHO, 1994; 2003; LORENZI, 1998).

Na literatura científica existem poucos trabalhos de pesquisa com *G. polymorpha*, sendo os de propagação praticamente inexistentes. Contudo, o cultivo de espécies florestais nativas, com finalidade econômica ou conservacionista, requer conhecimentos sobre a ecofisiologia das espécies, como subsídios à formulação de práticas adequadas às diferentes etapas do desenvolvimento vegetal (SILVA BELLO et al., 2008). Para que o processo de germinação ocorra é necessário que as sementes estejam viáveis e que as condições ambientais sejam favoráveis. Dentre os principais fatores ambientais pode-se citar a temperatura e a luz, que sendo conhecidos os seus efeitos podem ser controlados e

manipulados de forma a otimizar a porcentagem, velocidade e uniformidade da germinação, resultando na produção de mudas mais vigorosas (NASSIF et al., 1998).

Outro aspecto que deve ser considerado no processo germinativo é a qualidade sanitária das sementes (BRASIL, 2009). Conforme Carneiro (1987), sementes são estruturas atacadas por patógenos, o que afeta a qualidade e reduz a capacidade germinativa das mesmas. Para se obter uma boa muda, é necessário conhecer os microrganismos associados às sementes para que se possam adotar as medidas de controle adequadas. Em testes de germinação de laboratório, várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação superficial das sementes (WENDLING et al., 2006), entretanto, o sucesso no controle dos microrganismos vai depender do tipo de semente e de patógeno, do produto e das dosagens utilizadas nesses testes (DHINGRA et al., 1980).

Algumas espécies florestais nativas, a quantidade de sementes disponíveis em populações naturais não é suficiente para atender a demanda, tanto comercial quanto para a pesquisa. Isso é decorrente da dispersão das árvores em pequenos fragmentos de florestas naturais, da falta de sementes de boa qualidade genética (SILVA; HIGA, 2006) e da demora que algumas espécies apresentam para iniciar a produção de sementes (CALDAS, 2006), além da variação de fatores ambientais que tem intensificado a redução no aproveitamento das sementes. Por outro lado, algumas estratégias podem ser implantadas para mitigar esses problemas.

O desenvolvimento de técnicas silviculturais, como a interação entre plantas e microrganismos, é uma alternativa sustentável para estimular a germinação de sementes e o crescimento vegetal, mas é carente para a maioria das espécies florestais nativas (CALDAS, 2006). A técnica vem sendo amplamente pesquisada nas instituições de ensino e centros de pesquisa, sendo que alguns microrganismos têm sido relatados no controle biológico de fitopatógenos, na promoção da germinação de sementes e no crescimento vegetal de espécies agrícolas, com sucesso comprovado e outros com potencial de uso (MELO, 1998).

Fungos do gênero *Trichoderma*, conhecidos comumente por trichoderma, estão entre os microrganismos mais estudados como agentes no biocontrole de fitopatógenos, promotores da germinação de sementes e do crescimento vegetal (ALTOMARE et al., 1999; BENÍTEZ et al., 2004; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009; KUNIEDA-ALONSO et al., 2005; MELO, 1996). O sucesso da atividade dos bioagentes depende das propriedades e mecanismos de ação do organismo. Espécies de trichoderma podem agir através da competição, parasitismo direto, produção de metabólitos secundários e por serem parasitas de estruturas de resistência

de patógenos no ambiente, como esporos, em geral difíceis de serem destruídos (MELO, 1998).

A aplicação de isolados de trichoderma pode ser feita nas sementes, no substrato, no sulco de plantio ou em matérias orgânicas que serão incorporadas antes do transplante das mudas (LUCON, 2009). Mas, independente da forma de aplicação, há a necessidade de usar produtos biológicos como uma alternativa aos químicos, assim, os bioprodutos apresentam-se como uma tecnologia alternativa, que poderá ter um importante impacto na redução do uso de fungicidas e fertilizantes (LUZ, 2001).

Devido à importância de *G. polymorpha* como espécie florestal nativa e por inexistirem trabalhos da qualidade fisiológica e sanitária de suas sementes, se faz necessário estudos com essa espécie. Além disso, apesar da inestimável contribuição de espécies de trichoderma no controle de fitopatógenos, no aumento da germinação e do crescimento vegetal, poucos trabalhos são realizados envolvendo esses fungos antagonistas e espécies florestais. No entanto, os resultados desta interação poderão otimizar a produção de mudas para programas de reflorestamentos no Brasil, acelerar processos de recuperação de áreas degradadas, reduzir o extrativismo de florestas naturais, disponibilizar plantas para pesquisa e matéria prima para indústrias, além de preservar o meio ambiente e a biodiversidade.

Levando tais aspectos em consideração, este trabalho objetivou estudar a germinação das sementes de *G. polymorpha*, identificar os fungos associados aos diásporos e avaliar o efeito de *Trichoderma* spp. na promoção da germinação e do crescimento vegetal. Para isso avaliou-se a influência da temperatura e da luz, bem como o efeito da assepsia com hipoclorito de sódio (NaClO) na germinação das sementes e na contaminação dos diásporos; identificou-se os fungos associados aos diásporos; e o efeito de *Trichoderma* spp. na germinação *in vitro*, *ex vitro* e no crescimento vegetativo de *G. polymorpha*.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A espécie arbórea *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera

1.1.1 Descrição sobre *G. polymorpha*

De acordo com a classificação de Angiosperm Phylogeny Group – APG III (2009), *G. polymorpha* está inserida no clado das Campanulídeas – Euasterídeas II, na ordem Asterales e na família Asteraceae. O gênero *Gochnatia* é uma homenagem ao botânico francês Frederico Cn. Gochnat; e o epíteto específico, *polymorpha*, é uma alusão à grande plasticidade morfológica da espécie (CARVALHO, 2003).

Conforme Reitz (1973), *G. polymorpha* possui duas subespécies: subsp. *ceanothifolia* e subsp. *floccosa*. Ambas são árvores caracteristicamente campestres e se confundem morfológicamente quanto ao aspecto do tronco, casca e ramos. Apenas se diferenciam através de suas folhas que, em geral, a subsp. *floccosa* possui folhas maiores, tendo uma forma elíptica ou lanceolado-elíptica, enquanto que, as folhas da subsp. *ceanothifolia*, possuem forma oblongo-lanceolada, no entanto, suas utilidades são as mesmas. Além disso, *G. polymorpha* possui as seguintes sinónimas: *Moquinia polymorpha* (Less.) DC., *Gochnatia malmei* Cabrera e *Baccharis tomentosa* Steud. (THE PLANT LIST, 2010).

Gochnatia polymorpha é uma espécie arbórea de pequeno porte, nativa e com distribuição nos seguintes estados brasileiros: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A espécie também tem ocorrência natural no nordeste da Argentina e no norte e leste do Paraguai. Provavelmente devido à ampla distribuição geográfica, é grande o número de denominações vulgares, a exemplo de cambará-do-mato e candeia no estado de São Paulo; pau-candeia, cambarazinho e óleo-do-campo no Paraná e candeão ou candeias no Mato Grosso do Sul (CARVALHO, 1994; 2003; LORENZI, 1998). No Rio Grande do Sul, a espécie é conhecida popularmente por cambará (SOBRAL; JARENKOW, 2006).

Gochnatia polymorpha é classificada, de acordo com o grupo ecológico, em pioneira ou secundária inicial, cresce diretamente sobre os campos secos, propiciando o surgimento posterior de outras espécies arbóreas (BACKES; IRGANG, 2002). Comumente é observada

em solo de fertilidade química baixa, ocorrendo geralmente em solos arenosos, podendo também ser encontrada em terrenos úmidos, às margens dos rios, nas bordas da mata e nos capões, em condições de farta luminosidade (CARVALHO, 2003). No Rio Grande do Sul ocorre esporadicamente em todas as formações florestais (SOBRAL; JARENKOW, 2006).

A espécie apresenta normalmente 5 a 10 m de altura, sendo que indivíduos adultos atingem até 15 m. Poucas vezes o tronco é reto, quase sempre é tortuoso e inclinado, fuste normalmente curto, até 6 m de comprimento e geralmente com multitrancos. A ramificação é irregular, com copa baixa, arredondada e folhagem verde-clara. A casca externa é acastanhada com sulcos longitudinais profundos. As folhas são simples, alternas, discolors e o pecíolo é curto e piloso. As flores são pequenas, reunidas em capítulos de 1 cm de comprimento e estes formam panículas terminais (CARVALHO, 1994). Os frutos são do tipo cipsela, em que a semente é presa à parede do fruto por um só ponto e são coroados de um papilho cerdoso e piloso, o pappus (MARZINEK et al., 2008) (Figura 1). Os frutos constituem os diásporos, que são as unidades de dispersão da espécie.

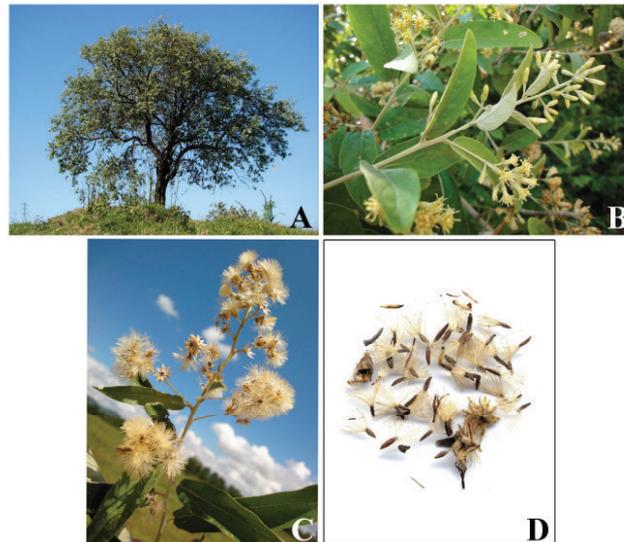


Figura 1 – *Gochnatia polymorpha*: (A) vista geral; (B) ramo com botões florais e capítulos com flores abertas; (C) infrutescências; (D) frutos

Fonte: (A) e (D) www.google.com.br; (B) e (C) Arquivo da autora

Conforme Lorenzi (1998), o desenvolvimento das plantas no campo é rápido, podendo atingir 3 a 4 m aos 2 anos, entretanto, Carvalho (2003) menciona que o crescimento é lento a moderado, sendo o crescimento em altura bastante expressivo até os 4 anos de idade. A fenologia é variável conforme a região (BACKES; IRGANG, 2002), sendo que, no Rio Grande do Sul, a floração ocorre durante os meses de outubro a dezembro e a maturação dos

frutos verifica-se nos meses de dezembro a fevereiro (LORENZI, 1998). Segundo Carvalho (2003), *G. polymorpha* produz anualmente grande quantidade de sementes, as quais são inclusas nos frutos e não apresentam dormência. Os frutos são facilmente disseminados pelo vento, sendo as sementes a principal forma de propagação da espécie, no entanto, perdem o poder germinativo em três meses e a germinação é baixa, entre 30 e 50%.

1.1.2 Importância de *G. polymorpha*

A árvore apresenta madeira pesada, dura, compacta, de grande duração sob condições adversas, tornando-a própria para obras imersas, construção civil, obras expostas, como moirões e pontes, para a confecção de cabos de ferramentas, artefatos de uso doméstico e em construção naval. Tanto o tronco como as raízes produzem curvas para embarcações, além de produzir carvão e lenha de boa qualidade (BACKES; IRGANG, 2002; CARVALHO, 1994; 2003; LORENZI, 1998).

A espécie apresenta características ornamentais, podendo ser empregada no paisagismo e na arborização de ruas e avenidas, devido seu sistema radicial dificilmente causar danos ao calçamento. As flores são melíferas e produzem néctar com 27 a 31% de açúcar. As folhas e cascas são empregadas na medicina popular na forma de chás como expectorante para as afecções bronco-pulmonares (BACKES; IRGANG, 2002; CARVALHO, 1994; 2003).

Estudos fitoquímicos realizados por Stefanello et al. (2006), com *G. polymorpha* subsp. *floccosa*, mostram que os extratos das cascas do tronco são mais ativos do que os extratos das folhas. Além disso, os resultados mostram ausência de citotoxicidade dos extratos no teste de letalidade contra *Artemia salina*, um indicador de que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico. Entretanto, para uma possível aplicação farmacêutica, são necessários estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade dos extratos bioativos.

Gochnatia polymorpha também apresenta possibilidades para a conservação do solo, principalmente por se desenvolver em distintos ambientes, como em locais bem drenados, locais com inundações periódicas de rápida duração ou com lençol freático superficial, o que a torna útil como planta fixadora de barrancas de rios (CARVALHO, 2003), sendo, portanto, indicada para a reposição de mata ciliar, recuperação de terrenos erodidos, reconstituição de ecossistemas degradados e reflorestamentos (GLUFKE, 1999; JUNIOR et al., 2005), além de ter os benefícios biológicos conhecidos, e defesa em Lei, para o uso de espécies nativas para esses fins, como no Código Florestal Lei Federal 4771/65, em seu inciso 3º, artigo 19, “no

caso de reposição florestal, deverão ser priorizados projetos que contemplem a utilização de espécies nativas”.

Em levantamento realizado pela Rede Mata Atlântica de Sementes Florestais (RioEsBa), rede de fomento à oferta de sementes e propágulos de espécies nativas, foi constatado em diversas instituições de pesquisa que as espécies mais demandadas pelo mercado, não são necessariamente as mais pesquisadas. A Rede RioEsBa, buscando direcionar os trabalhos de pesquisa, selecionou uma lista de espécies prioritárias, considerando a demanda de colhedores e viveiristas na área de abrangência da Rede (Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia), nessa lista, *G. polymorpha* está presente na classe de uso energético (PIÑA-RODRIGUES et al., 2007a).

1.2 Situação atual das florestas brasileiras

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo por possuir uma grande variação de clima e de vegetação distribuídos entre os seus biomas (Figura 2). No entanto, a destruição de florestas e matas é uma prática frequente em várias regiões do País (INMETRO; IDEC, 2002), o que leva a um declínio contínuo do número de espécies que habitam os ecossistemas brasileiros.

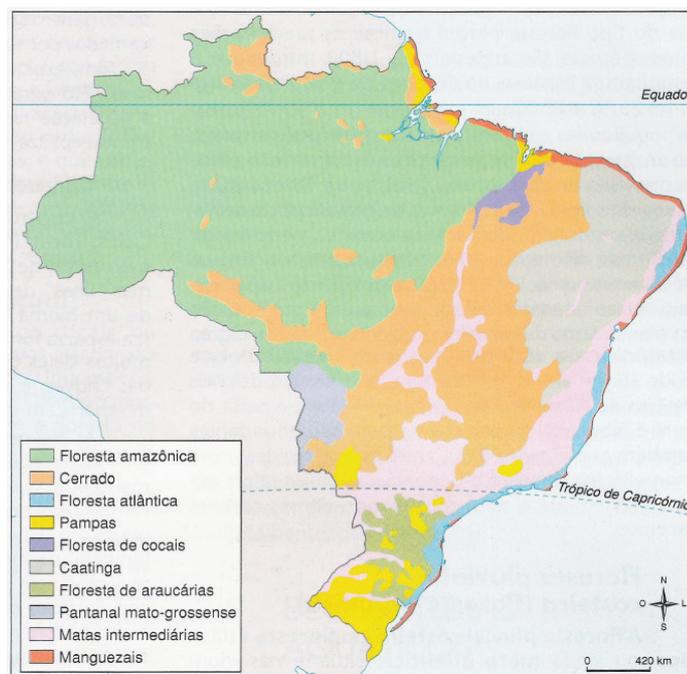


Figura 2 – Mapa dos principais biomas brasileiros em sua distribuição original
Fonte: AMABIS; MARTHO, 2006.

A floresta tropical brasileira se encontra em estágio de grande devastação. O bioma Mata Atlântica que cobria 13% do território brasileiro, possui uma cobertura estimada em 7,3% de sua cobertura original. A Caatinga que cobria 12,4% do território brasileiro está reduzida à aproximadamente 30% de sua cobertura original. O Cerrado que cobria 21,6% do território brasileiro está reduzido à aproximadamente 45% de sua cobertura original. A Amazônia, o maior bioma brasileiro, originalmente cobria uma área correspondente a 48% do território brasileiro, hoje possui aproximadamente 85% de sua cobertura original (SILVA; HIGA, 2006).

Gochnatia polymorpha habita naturalmente as Florestas da Mata Atlântica, Florestas de Araucárias, Cerrado e campos gerais e rupestres do bioma Pampa (Figura 3) (CARVALHO, 1994; 2003), sendo a grande maioria desses biomas encontrados, senão característicos, do Rio Grande do Sul. A Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros onde o processo de desmatamento está mais avançado (SILVA; HIGA, 2006), do qual o Rio Grande do Sul tem apenas 7,48% de sua extensão original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2011) e a maior parte da vegetação original do Pampa foi destruída para dar lugar a áreas cultiváveis (AMABIS; MARTHO, 2006).

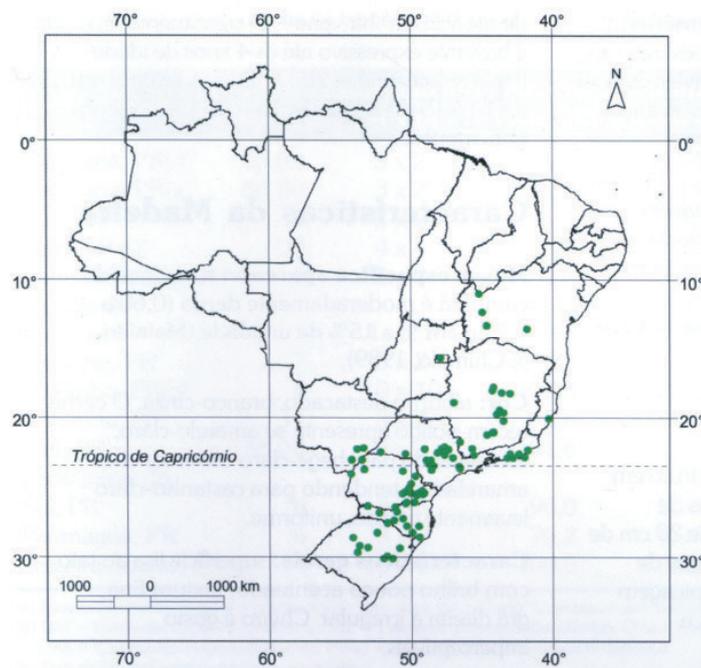


Figura 3 – Mapa dos locais de ocorrência natural de *Gochnatia polymorpha* no Brasil
Fonte: CARVALHO, 2003.

Embora existam muitos movimentos para a preservação do que resta da Mata Atlântica, ela continua ameaçada pela pressão constante de produtores de carvão, madeireiras,

agricultores, especuladores imobiliários, construtores de estradas, implantadores de atividades industriais, entre outros (SILVA; HIGA, 2006). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), as principais causas da degradação ambiental é a conversão das florestas para a agricultura e o uso excessivo dos recursos das matas (MORAES et al., 2006), a exemplo das sementes e partes vegetativas utilizadas na preparação de medicamentos e cosméticos. A procura por fitoterápicos e cosméticos com extratos vegetais vem crescendo nos últimos anos, sendo um dos desafios para a produção, o cultivo das plantas em larga escala de modo sustentável, sem o comprometimento dos recursos naturais (MORANDI, 2009).

A coleta indiscriminada das sementes e partes vegetativas pode levar as espécies envolvidas à extinção, por representar um risco à preservação do patrimônio genético vegetal. No Paraná e sul do Brasil, a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), espécie florestal não madeireira, usada para tratamento de gastrite e úlcera gástrica, é amplamente procurada, sendo que a coleta clandestina de suas folhas chega a toneladas, o que poderá levar a espécie ao risco de extinção. A melhor forma de garantir as características fitoquímicas e farmacológicas do produto para o mercado é o cultivo das plantas em áreas específicas, dentro de padrões agronômicos requeridos, buscando a produtividade e a qualidade do material, além de preservar as florestas naturais (CORRÊA JUNIOR et al., 2006).

Sob essa perspectiva, as fortes pressões antrópicas e os impactos decorrentes têm despertado a atenção da sociedade em âmbito nacional e internacional. Iniciativas têm sido adotadas com o objetivo de reduzir ou minimizar esses impactos, como ações para racionalizar o uso dos recursos florestais, implantar áreas de cultivo, ampliar áreas de preservação e conservação, além de recuperar áreas já degradadas (NETO; SILVA, 2007). A preocupação em recuperar áreas degradadas está ligada a fatores como a recomposição da paisagem, a conservação de recursos hídricos e da qualidade da água, a fixação e a conservação da fauna e da flora nativa, a preservação das encostas, a contenção da erosão, a prevenção do assoreamento dos cursos d'água e o cumprimento da legislação ambiental vigente (GLUFKE, 1999).

No entanto, de maneira geral, é observada uma baixa diversidade de espécies arbóreas sendo utilizada em projetos de conservação, arborização e reflorestamento, em comparação com a diversidade presente nas matas nativas. Na Mata Atlântica, por exemplo, a diversidade arbórea é estimada em 20.000 espécies. Esse baixo aproveitamento é decorrente, muitas vezes, do desconhecimento de técnicos e viveiristas em relação ao potencial das espécies nativas e da baixa diversidade de mudas no mercado (PIÑA-RODRIGUES et al., 2007a).

Além disso, outros fatores que limitam o uso de espécies nativas são a falta de sementes de boa qualidade e, em decorrência desse fato, o elevado valor das mudas que chegam ao tamanho mínimo para o plantio (SILVA; HIGA, 2006).

1.3 Sementes florestais

A produção de mudas florestais nativas para os mais diversos interesses só é possível quando há disponibilidade de sementes. Entretanto, essa disponibilidade não deve ser considerada somente em termos quantitativos, mas em termos qualitativos (NETO; SILVA, 2007). A qualidade da semente é um dos suportes fundamentais de um empreendimento florestal e tecnicamente refere-se às características relativas às propriedades genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias das sementes (CARVALHO; NAKAGAVA, 1988).

No que se refere à qualidade fisiológica, a avaliação pode ser realizada utilizando-se o teste de germinação e testes de vigor (VIEIRA et al., 1994). A International Seed Testing Association (ISTA) e a Association of Official Seed Analysts (AOSA), propuseram alguns testes de vigor que seriam os mais indicados. Entre estes, a velocidade de germinação e testes baseados na avaliação das plântulas, como o comprimento e peso da matéria seca da plântula (NAKAGAVA, 1994).

A qualidade sanitária é um fator de extrema importância quando se trata de qualidade de sementes, pois se refere a testes que permitem identificar microrganismos associados às mesmas (PIÑA-RODRIGUES et al., 2004), na maioria das vezes, microrganismos patogênicos (CHEROBINI, 2006). A epidemia de muitas doenças pode ter início com inóculo contido nas sementes, e estas, são um dos veículos mais importantes de transmissão dos patógenos. Além dos aspectos de transmissão e consequências epidemiológicas, a presença de certos patógenos em sementes pode resultar em efeitos diretos como redução no potencial germinativo, vigor, emergência, período de armazenamento e até rendimento (PEDROSO, 2009).

A partir da década de 90, as metodologias de avaliação da qualidade das sementes evoluíram, muitas vezes antecipando-se ao uso em larga escala de novas técnicas de produção. No Brasil, esse processo ocorre de forma lenta, mas sua existência pode ser verificada nos trabalhos científicos publicados. Apesar disso, as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), publicação oficial que preconiza os métodos de avaliação da qualidade de sementes, ainda não incorporam os avanços da pesquisa nas regiões tropicais,

sobretudo com espécies florestais brasileiras (FIGLIOLIA et al., 2007; PIÑA-RODRIGUES et al., 2004).

As RAS é o mais importante instrumento do setor, uma vez que contém os padrões e procedimentos adotados e recomendados pelo Ministério da Agricultura para a avaliação da qualidade das sementes. Esses padrões baseiam-se nas regras internacionais conduzidas através da ISTA e são definidos após ampla pesquisa em vários laboratórios credenciados pelo Ministério e que geram informações que passam a constar nas RAS (PIÑA-RODRIGUES et al., 2007b).

No Brasil, há diversos pesquisadores que trabalham com espécies florestais nativas e procuram conduzir estudos que forneçam informações sobre a qualidade das sementes e a padronização dos métodos de análise (MACHADO et al., 2002), no entanto, as espécies florestais brasileiras contidas nas RAS representam cerca de 0,2%, dado inexpressivo diante da grande diversidade de espécies que compõem os diversos biomas vegetais brasileiros (FIGLIOLIA et al., 2007), prevalecendo as espécies agrícolas e as florestais que possuem maior valor econômico (CHEROBINI, 2006).

As principais dificuldades apontadas pelos pesquisadores para inserir tais espécies nas regras, tanto nacionais quanto internacionais, é a falta de sementes para a realização dos testes, pois são necessárias grandes quantidades, o que não é possível devido à irregularidade de produção e a alta deterioração pela fauna. A variabilidade de características e desuniformidade de maturação prejudicam a obtenção de lotes homogêneos, como requerem os testes de aferição. Além disso, há falta de laboratórios de sementes florestais credenciados, havendo apenas três no Brasil e carência de pesquisas (PIÑA-RODRIGUES et al., 2007b).

Sob essa perspectiva, há uma grande necessidade de se estudar o potencial e o comportamento de sementes florestais nativas em diferentes regiões (CHEROBINI, 2006), como forma de contribuir para a padronização das normas, visando à produção de mudas. *G. polymorpha*, assim como outras espécies, tiveram suas populações naturais devastadas pela ação antrópica, sendo que, a extinção de uma espécie significa a perda de combinações gênicas únicas e insubstituíveis, que segundo Flôres (2007), serão a base para o melhoramento genético através da biotecnologia que vem evoluindo constantemente, o que justifica a conservação genética dessa espécie como algo de suma importância para garantir a preservação dos seus genes.

1.3.1 Qualidade fisiológica de sementes

O teste de germinação é um dos parâmetros da qualidade fisiológica da semente, sendo o método mais utilizado para se determinar a qualidade de um lote, além de possibilitar a avaliação da viabilidade sob condições favoráveis para fins de semeadura e produção de mudas (OLIVERA et al., 2008; PIÑA-RODRIGUES et al., 2004).

A germinação, no critério botânico ou morfológico, é um fenômeno biológico que pode ser considerado como a retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento da semente pela protrusão de uma das partes do embrião de dentro dos envoltórios, na maioria dos casos, a radícula. Entretanto, os tecnologistas de sementes consideram germinação, o emergir da plântula no solo ou a formação de uma plântula vigorosa no substrato utilizado. Neste critério, a germinação é definida como a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando a sua capacidade para dar origem a uma plântula normal, sob condições ambientais favoráveis (BORGHETTI; FERREIRA, 2004; NASSIF et al., 1998).

Observa-se que o critério tecnológico mistura dois fenômenos fisiológicos diferentes, a germinação da semente e o crescimento inicial da plântula. A diferença se estabelece no momento em que, para a germinação da semente, muitos genes são acionados e regulados pelas condições vigentes. No crescimento inicial da plântula, outros genes são acionados e alguns da germinação, desligados ou reprimidos. No entanto, para estudos sob condições de campo, esse critério é bastante apropriado (BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

O objetivo do teste de germinação é determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, o qual pode ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e estimar o valor para semeadura em campo. Geralmente a realização desse teste em condições de campo não é satisfatória, devido às variações ambientais. Métodos de análise em laboratório, efetuados em condições controladas de fatores como substrato, temperatura e luz, têm sido estudados e desenvolvidos de maneira a permitir uma germinação mais regular, rápida e completa das amostras de sementes de uma determinada espécie (BRASIL, 2009; PIÑA-RODRIGUES et al., 2004).

As sementes germinam quando as condições para o crescimento do vegetal são favoráveis e elas não apresentam algum tipo de dormência (CASTRO et al., 2004a). A primeira exigência para a germinação é a água, que exerce influência determinante sobre o processo. Da absorção de água resulta a reidratação dos tecidos da semente com a consequente intensificação da respiração e de todas outras atividades metabólicas, que

culminam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada do crescimento do eixo embrionário. Com a absorção da água ocorre também o aumento de volume da semente, provocando o rompimento do tegumento, o que vem, posteriormente, facilitar a emergência do eixo embrionário do interior da semente (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988).

A qualidade fisiológica de um lote de sementes pode ser avaliada usando-se o teste de germinação desde que o lote apresente alta homogeneidade, entretanto, se o mesmo apresentar alto grau de heterogeneidade, o teste não apresenta alta sensibilidade e, nesse caso, os testes de vigor são complementares (VIEIRA et al., 1994).

O vigor das sementes é o reflexo de um conjunto de características ou propriedades que determinam o seu potencial fisiológico, ou seja, a capacidade de apresentar desempenho adequado quando expostas a diferentes condições de ambiente. Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar o vigor com segurança. O objetivo básico dos testes de vigor é a identificação precisa de diferenças importantes na qualidade fisiológica dos lotes, principalmente dos que possuem poder germinativo semelhante (MARCOS FILHO, 1994).

Os testes de vigor realizados em laboratório, sob condições controladas, são relacionados dentro dos chamados métodos indiretos e são instalados, em sua maioria, nas mesmas condições do teste de germinação e a seguir são avaliadas determinadas características da germinação das sementes ou da emergência das plântulas, conforme o critério adotado pelo avaliador. Em condições de laboratório, entre os testes de vigor mais utilizados estão a velocidade de germinação e a primeira contagem do teste de germinação da semente ou da plântula. (NAKAGAWA, 1994).

Os testes de vigor realizados em condições de campo inserem-se dentro dos chamados métodos diretos e são conduzidos em condições naturais de ambiente, de preferência na época recomendada para a semeadura da espécie em avaliação. Em condições de campo, entre os mais utilizados estão características envolvendo a plântula, como: porcentagem de emergência, velocidade de emergência, altura ou comprimento, peso da massa verde e peso da massa seca. Estes testes têm sido os mais utilizados em condições brasileiras, principalmente em pesquisa (NAKAGAWA, 1994).

1.3.1.1 Temperatura e luz na qualidade fisiológica de sementes

O processo germinativo de um lote é influenciado por uma série de condições internas da semente, por fatores do ambiente e por práticas de manejo. Em relação aos fatores do

ambiente, a disponibilidade de água, temperatura e oxigênio são consideradas essenciais e exercem influência direta sobre a germinação. A luz não tem sido incluída como fator imprescindível, porque para muitas espécies a germinação poderá ocorrer tanto na presença quanto na ausência de luz, mas para determinadas culturas a luz é um fator limitante (MARCOS FILHO, 2005). Neste estudo serão abordados os fatores temperatura e luz.

Durante o processo de germinação ocorre uma série de atividades metabólicas, baseadas em reações químicas e cada uma delas apresenta determinadas exigências quanto à temperatura, principalmente porque dependem da atividade de sistemas enzimáticos complexos, cuja eficiência é diretamente relacionada à temperatura e à disponibilidade de oxigênio (MARCOS FILHO, 2005). Assim, a temperatura é um fator que atua sobre a velocidade de absorção de água e também sobre as reações bioquímicas que determinam todo o processo. Em consequência, afeta a velocidade, a uniformidade e também a porcentagem de germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988).

Partindo do princípio de que a temperatura ideal para a germinação é resultado da adaptação fisiológica das sementes às condições ambientais dos locais de origem, ocorrência ou de cultivo da espécie, pode haver relação direta entre essa temperatura e o bioma onde as sementes foram produzidas. Além desse fator, características ecológicas da espécie, tal como o grupo ecológico, ou seja, pioneiras, secundárias ou climácicas, podem ter participação na definição da temperatura que mais estimula a germinação (BRANCALION et al., 2010). Todavia, em algumas espécies, a relação entre a temperatura e a germinação não se mostra tão dependente (BRYANT, 1989).

A abertura de clareiras no dossel de florestas altera a temperatura e os espectros de luz que atingem o solo, estimulando a germinação de sementes de várias espécies, principalmente a das pioneiras. Entretanto, diversas outras espécies, incluindo pioneiras, secundárias e climácicas, têm sua germinação estimulada e favorecida por temperaturas constantes, mas não pela luz (BRANCALION et al., 2008). Ainda, em outras espécies, o requerimento de luz para germinação é fortemente influenciado pela temperatura, sendo que a faixa de temperatura dentro da qual as sementes germinam é característica de cada espécie. Em razão disso, a influência desses fatores na germinação de sementes florestais tem sido estudada como uma forma de avaliar quais são as condições ecológicas mais favoráveis ao processo germinativo de cada espécie em seus ambientes naturais (NASSIF et al., 1998).

A germinação ocorre num intervalo de temperaturas, cujos extremos dependem principalmente da espécie e suas características genéticas, das condições do ambiente durante a produção, do manejo durante e após a colheita e da sanidade da semente (MARCOS

FILHO, 2005). Assim, existem temperaturas mais apropriadas, como temperaturas limitantes (CASTRO et al., 2004a; MONDO et al., 2008). Entre os pesquisadores, existe um consenso, que a temperatura para a germinação não apresenta um valor específico, mas pode ser expressa em termos das temperaturas cardiais, isto é, mínima, máxima e ótima. A temperatura ótima é conceituada aquela em que ocorre o máximo de germinação em tempo relativamente curto (MACHADO et al., 2002).

A literatura evidencia que para a maioria das espécies tropicais e subtropicais, a faixa ótima de temperatura para a germinação se dá entre 15 e 30°C, com temperaturas alternadas de 20 a 30°C e de 10 a 30°C (PIÑA-RODRIGUES et al., 2004). A temperatura adequada para a germinação de sementes arbóreas nativas vem sendo determinada por alguns pesquisadores. Como exemplo, foi determinado 25°C para o angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) (MONDO et al., 2008) e também para a aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*) (PACHECO et al., 2006). Para canafístula (*Peltophorum dubium*) foi determinado a temperatura de 30°C (OLIVEIRA et al., 2008). Machado et al. (2002), concluíram que a faixa ótima de temperatura para a germinação de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) é de 25 a 35°C. Para barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), Martins et al. (2008), determinaram as constantes de 20, 25 ou 35°C ou alternadas 20-30°C. Mas para *G. polymorpha* ainda não há estudos conhecidos.

Referente à sensibilidade luminosa, existe uma ampla variação nas respostas germinativas em relação à luz (MENEZES et al., 2004; NASSIF et al., 1998). Há sementes que necessitam de luz para germinar, enquanto que, em algumas espécies a luz inibe a germinação (FERREIRA, 2004). Existem muitas outras que se apresentam indiferentes à luminosidade (NASSIF et al., 1998).

Desse modo, as sementes podem ser classificadas em três grupos em relação à resposta à luz: fotoblásticas positivas, as que necessitam da presença de luz para a germinação, a exemplo de goiaba-serrana (*Acca sellowiana*), guabiju (*Myrcianthes punges*) e araçá (*Psidium cattleianum*) (SANTOS et al., 2004); fotoblásticas negativas, as que germinam na ausência de luz, como cravo-do-mato (*Tagetes minuta*) (FERREIRA et al., 2001) e as fotoblásticas neutras ou não fotoblásticas, as quais são indiferentes à luz, como por exemplo, aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (SILVA et al., 2002), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) (MONDO et al., 2008) e murta (*Blepharocalyx salicifolius*) (REGO et al., 2009).

O responsável pela fotorreação, controlando a germinação, é um pigmento denominado fitocromo; trata-se de uma cromoproteína solúvel, presente no citoplasma de células do eixo embrionário (MARCOS FILHO, 2005). O pigmento fitocromo tem sido

considerado o principal agente envolvido na percepção do sinal luminoso que induz a germinação e encontra-se sob duas formas principais: a forma ativa e a forma inativa. A forma inativa ao absorver luz vermelha (660nm) se transforma na forma ativa. Em contrapartida, a forma ativa quando absorve luz na região do vermelho extremo do espectro (730 nm) transforma-se novamente na forma inativa (BORGHETTI, 2004).

Para a maior parte das sementes fotoblásticas, a forma ativa promove a germinação (ZAIDAN; BARBEDO, 2004). Nessa forma, o fitocromo atinge concentrações suficientes para disparar o processo de germinação, mediante a síntese de hormônios e o reinício da transcrição da mensagem genética (MARCOS FILHO, 2005). As sementes fotoblásticas negativas necessitam de baixa concentração da forma ativa do fitocromo. Já as sementes classificadas como fotoblásticas neutras ou não fotoblásticas, que são indiferentes à luz, podem germinar sob concentrações baixíssimas da forma ativa (MARCOS FILHO, 2005).

1.3.2 Qualidade sanitária de sementes

A associação de microrganismos às sementes é outro importante fator que pode influenciar na qualidade das mesmas (LUCCA FILHO, 1987). A presença de certos patógenos pode resultar em efeitos diretos sobre as sementes, como redução no potencial germinativo, vigor, emergência, período de armazenamento e até rendimento (ARAÚJO; ROSSETTO, 1987; PEDROSO, 2009). Esses patógenos, presentes nas sementes, tornam-se ativos tão logo encontrem condições favoráveis, podendo não só atacar a semente, mas também a plântula, quando esta estiver emergindo do solo (DHINGRA et al., 1980). Além disso, sementes infestadas por patógenos, podem ser responsáveis pela disseminação de agentes fitopatogênicos de uma região para outra, podendo contaminar áreas isentas de doenças (LAZAROTTO, 2010).

As sementes florestais nativas apresentam, de maneira geral, baixas porcentagens de germinação, devido às anormalidades e lesões provocadas por microrganismos (VECHIATO, 2010). Os maiores problemas ligados a doenças ocorrem durante a germinação e formação de mudas (CARNEIRO, 1987). Vários microrganismos podem causar prejuízos às culturas quando associados às sementes, porém aos fungos deve ser dada maior atenção, devido a seu caráter agressivo e decompositor que acarreta em um grande número de espécies fitopatogênicas e também por sua capacidade de sobreviver nas condições de ambiente adequadas à manutenção da viabilidade das sementes, durante o período de armazenamento (CHEROBINI, 2006; KRUPPA; RUSSOMANNO, 2009).

A identificação desses fungos pode ser realizada por meio de testes de sanidade, sendo que os métodos recomendados para detecção dos mesmos e que podem ser utilizados em sementes de florestais são: método do papel de filtro (blotter-test) e método do plaqueamento em meio ágar sólido, como o meio de cultura BDA (extrato de batata, dextrose e ágar) (CARNEIRO, 1987; VECHIATO, 2010).

Alguns trabalhos foram conduzidos verificando-se a presença de microrganismos em sementes florestais. Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Cladosporium*, *Cylindrocladium*, *Colletotrichum*, *Ulocladium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Mucor*, *Periconia*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Lembosia*, *Trichothecium*, dentre outros foram detectados em sementes de espécies florestais, mostrando diminuir a qualidade das mesmas (BITENCOURT; HOMECHIN, 1998; MAGALHÃES et al., 2008; MUNIZ et al., 2007; MARTINELLI-SENEME, et al., 2006; PADULLA et al., 2010; SANTOS et al., 2001).

Alguns gêneros são considerados potencialmente patogênicos às sementes florestais, podendo ocasionar podridão, manchas foliares e danos em plântulas, a exemplo de *Pestalotia*, *Botrytis*, *Phoma*, *Coletotrichum*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Macrophomina*, *Curvularia* e *Fusarium* (Figura 4). Há ainda os fungos saprófitas como *Epicoccum* e *Nigrospora* que são comumente detectados em sementes submetidas à análise de sanidade (VECHIATO, 2010).



Figura 4 – Imagens microscópicas dos fungos patogênicos: (A) *Alternaria* sp.; (B) *Curvularia* sp.; (C) *Fusarium* sp. Fonte: www.google.com.br

Os fungos associados às sementes podem ser divididos em dois grupos: fungos de campo e fungos de armazenamento. Os fungos de campo estabelecem-se na semente durante o período de crescimento e maturação, ou seja, antes da colheita. Após essa fase, o grupo denominado de fungos de armazenamento pode invadir a semente, tendo como principais representantes os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 5), que causam podridão e deterioração das mesmas (WETZEL, 1987; VECHIATO, 2010).

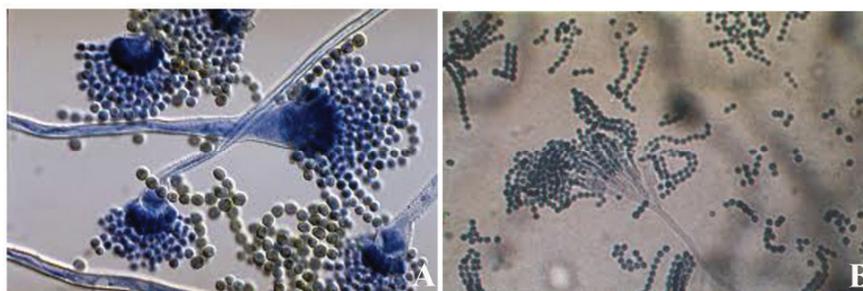


Figura 5 – Imagens microscópicas dos fungos: (A) *Aspergillus* sp.; (B) *Penicillium* sp.
Fonte: www.google.com.br

A associação de fungos com sementes pode ocorrer pela contaminação superficial ou por colonização dos tecidos internos. Quando a associação é superficial, ou seja, externamente, o patógeno fica aderido à superfície da semente, sem infectá-la e é mais fácil controlá-lo pelo tratamento das sementes. O maior desafio ao controle de patógenos é constituído por aqueles que colonizam os tecidos atuando internamente, pois ficam protegidos contra a maioria dos tratamentos de desinfestação. Nestes casos, o patógeno poderá estar presente em qualquer parte da semente, na casca, no endosperma e/ou no embrião, onde se apresenta sob a forma de micélio dormente e deverá retomar o seu crescimento vegetativo quando as sementes germinarem (DHINGRA et al., 1980).

Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação superficial das sementes. Os mais comuns são o etanol 70% e os compostos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio (NaClO). As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos princípios ativos e os tempos de exposição da semente a elas variam de acordo com o tipo de semente e de patógeno, bem como dos produtos químicos utilizados (WENDLING et al., 2006).

Sob essa perspectiva, a detecção e identificação de microrganismos em sementes florestais nativas são de grande importância, uma vez que as informações sobre a associação patógeno-semente, destas espécies, são escassas e pouco estudadas (BOTELHO et al., 2008; CAMARGO, 2007). A identificação dos patógenos associados às sementes é a primeira etapa de um estudo visando os danos que estes microrganismos podem causar às sementes e às mudas (BOTELHO et al., 2008), o que permite recomendar tratamentos específicos para organismos conhecidos por causar danos na espécie estudada (LAZAROTTO, 2010).

Entre as medidas preventivas para evitar perdas no campo, recomenda-se o emprego de algumas técnicas de manejo, como o tratamento com produtos biológicos que também poderão ser associados aos químicos. O tratamento biológico, especialmente em sementes de

espécies florestais nativas é a alternativa mais desejável, pois é um método não poluente, não agride o meio ambiente, o controle é exercido pelo desequilíbrio ecológico dos patógenos alvo e oferece uma ação duradoura. Alguns bioprodutos à base do fungo *Trichoderma harzianum* têm se mostrado eficientes e promissores no controle de fungos patogênicos (VECHIATO, 2010). Além disso, espécies de trichoderma são utilizadas também como promotoras da germinação de sementes e do crescimento vegetal (ALTOMARE et al., 1999).

1.4 Gênero *Trichoderma*

Espécies de *Trichoderma*, conhecidas comumente por trichoderma, compreendem fungos de vida livre, que se reproduzem assexuadamente, presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical. Esses fungos também colonizam madeira, onde a fase sexual teleomorfa é frequentemente encontrada. Muitas linhagens não possuem ciclo sexual conhecido (HARMAN et al., 2004a), sendo classificadas na sub-divisão Deuteromycotina. Os deuteromicetos são caracterizados pela produção de conídios, que são esporos assexuais formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas, os conidiomas, ou ainda por fragmentação do talo micelial (KRUGER; BACCHI, 1995).

Algumas linhagens de trichoderma são utilizadas no controle biológico de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal, devido a sua versatilidade de ação, como parasitismo, antibiose e competição; além de atuarem como indutores de resistência a plantas contra doenças e produzirem hormônios de crescimento. Essas características as tornam os fungos mais pesquisados em condições de laboratório, casa de vegetação e a campo (ALTOMARE, et al., 1999; DELGADO et al., 2007; FILHO et al., 2008; HARMAN, 2000; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009; LOUZADA, et al., 2009; RESENDE et al., 2004). Além disso, há dezenas de produtos à base de trichoderma disponíveis no mercado para comercialização (LOPES, 2009).

Desde o trabalho pioneiro de Weindling e Fawcett, em 1936, sobre o uso de isolados de trichoderma no controle de doenças causadas em espécies de citros por *Rhizoctonia solani*, estudos têm sido realizados, na tentativa de isolar fungos eficazes na repressão de doenças de plantas causadas por outros fungos. Pesquisas têm sido direcionadas para a promoção do crescimento vegetal e apresentam aumento no crescimento e na produtividade de diversas culturas como cravo, crisântemo, pepino, berinjela, ervilha, pimentão, rabanete, tabaco, tomate, alface, cenoura, milho, papoula, algodão, feijão, arroz, grão de bico, eucalipto, entre

outras (ALMANÇA, 2005; FILHO et al., 2008; FORTES et al., 2007; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009; JYOTSNA et al., 2008; RESENDE et al., 2004).

Os mecanismos de trichoderma na promoção de crescimento vegetal, em ausência de fitopatógenos, são pouco esclarecidos em comparação aos mecanismos de ação envolvendo o controle biológico (POMELLA; RIBEIRO, 2009). De acordo com pesquisa *in vitro*, realizada por Altomare et al. (1999), a promoção de crescimento em plantas promovida por *T. harzianum* isolado T-22, está na sua habilidade de solubilizar nutrientes importantes para a planta. Segundo Baugh e Escobar (2007), a ação de trichoderma como estimulador do crescimento vegetal é complexa e realizada por interações com fatores bioquímicos e produção de diversas enzimas e compostos benéficos.

1.4.1 Mecanismos de ação de *Trichoderma*

Vários são os mecanismos de ação de trichoderma no controle biológico de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal existentes. Cabe ressaltar que, de acordo com Harman (2000), provavelmente existam outros mecanismos que ainda não foram descobertos.

1.4.1.1 Parasitismo

O parasitismo designa uma relação nutricional entre dois seres vivos em que um dos componentes da relação, o parasita, obtém todo ou parte de seu alimento às custas do outro componente, o hospedeiro. O hiperparasitismo é um nível mais elevado de parasitismo, no qual o hospedeiro é também um parasita (STADNIK; BETTIOL, 2000). Trichoderma possui característica hiperparasita, pois pode detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira e formar estruturas semelhantes à apressórios utilizadas para enrolar-se fortemente em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa (MELO, 1998). Harman (2000) denomina esse mecanismo de micoparasitismo e ressalta ser um importante mecanismo de ação de biocontrole.

O processo descrito acima é complexo, envolvendo o crescimento do agente de biocontrole em direção aos fungos-alvo, mediado por reconhecimento do patógeno, fixação das hifas de trichoderma sobre as hifas do patógeno e, finalmente, ataque e dissolução da parede do fungo-alvo, pela atividade das enzimas que sintetiza. Assim, a relação hospedeiro-

parasita é caracterizada por um período relativamente longo de contato, que pode ser físico ou metabólico com digestão por enzimas hidrolíticas, como, quitinases, proteases, glucanases e lipases (BETTIOL, 1991; MELO; FAULL, 2000).

1.4.1.2 Antibiose

A antibiose é definida como a interação na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (STADNIK; BETTIOL, 2000). Dentre as substâncias que podem ser sintetizadas, muitas espécies já estudadas produzem metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. Esses metabólitos podem ser voláteis e não-voláteis. Dos antibióticos produzidos por trichoderma, Bastos (1991) cita gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina, os quais têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos. Em torno de 40 substâncias produzidas por trichoderma possuem atividade antibiótica, não incluindo as enzimas (HARMAN, 2000).

Harman (2000) considera a inativação de enzimas de patógenos outro mecanismo de biocontrole. De acordo com pesquisas realizadas pelo autor, o fungo patogênico *Botrytis cinerea* depende da produção de enzimas pectinolíticas, cutinolíticas e celulolíticas para infectar as plantas. No entanto, os conídios de duas linhagens de *Trichoderma harzianum* (T39 e NCIM1185), quando aplicados nas folhas, produzem uma protease que é capaz de degradar enzimas sintetizadas pelo patógeno, que são utilizadas por este para destruir a parede celular das plantas, reduzindo, assim, a capacidade do patógeno infectar o vegetal. As proteases podem ser diretamente tóxicas para a germinação do patógeno.

1.4.1.3 Competição

A competição é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação, dependentes de um ou mais fatores iguais, necessários à sobrevivência. Essa competição pode ocorrer por espaço, oxigênio e principalmente por nutrientes. A competição por nutrientes é um mecanismo importante, pois muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes (BENÍTEZ et al., 2004). Esse é considerado um dos clássicos mecanismos de biocontrole. Trichoderma compete com fitopatógenos pelos exsudatos liberados pelas sementes no processo de germinação os quais estimulam a germinação de fungos fitopatogênicos (HARMAN, 2000).

1.4.1.4 Indução de resistência

A indução de resistência por trichoderma é um mecanismo de ação que vem sendo pesquisado nos últimos anos. As plantas levadas ao estado de indução apresentam aumento nas atividades de enzimas, tais como, quitinases, glucanases e peroxidases, envolvidas nas rotas de percepção da presença de patógenos em potencial e nas rotas de sinalização bioquímica a pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado (ROMEIRO, 2007). Por consequência, verifica-se um aumento nas atividades de enzimas envolvidas na síntese de componentes de resistência (HWANG; BENSON, 2002; SNEH; ICHIELEVICH-AUSTER, 1998).

1.4.1.5 Promoção de crescimento vegetal

A promoção de crescimento pela aplicação de trichoderma foi inicialmente relacionada ao controle biológico dos microrganismos prejudiciais presentes no solo. Na ausência de fitopatógenos, o crescimento tem sido relacionado à produção de hormônios ou outros fatores de crescimento, além de maior disponibilidade e eficiência na absorção de alguns nutrientes pela planta (LUCON, 2009).

Alguns isolados de trichoderma são capazes de atuar como bioestimulantes do crescimento radicular através de fitohormônios e melhorando a utilização de nutrientes pela planta, o que aumenta a resistência diante de fatores bióticos não favoráveis, além de degradar fontes de nutrientes que são importantes para o desenvolvimento do vegetal (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004b).

Filho et al., (2008) observaram produção de ácido indolacético (AIA) em isolados de trichoderma. De acordo com os resultados obtidos, nos isolados CEN 209 e CEN 500, a produção desse hormônio foi detectada em baixos níveis, no entanto, o isolado CEN 262 revelou níveis consideravelmente superiores em relação aos demais isolados pesquisados. A concentração elevada de AIA verificada nas análises do isolado CEN 262 são compatíveis com os valores obtidos nos experimentos relativos ao desenvolvimento de miniestacas de eucalipto clonal, que atingiu aumento de 137%, 145% e 43% da parte aérea, da raiz e na altura das plantas, respectivamente, comparados ao controle.

Em pesquisas realizadas com a planta *Arabidopsis thaliana* foi estudado o papel de uma auxina na regulação do crescimento da planta em resposta à inoculação de *Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride*, desenvolvendo um sistema de interação fungo-planta, o qual

resultou em características fenotípicas relacionadas com a auxina, como o aumento da produção de biomassa e estimulação do desenvolvimento das raízes laterais (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009).

A promoção de crescimento pode também estar relacionada à solubilização de nutrientes necessários às plantas. Altomare et al. (1999) mostraram que um isolado de *T. harzianum* teve habilidade para solubilizar nutrientes a partir de compostos como rochas de fosfato, óxido de manganês, óxido de ferro e zinco metálico. Alguns autores citam que essa solubilização seria devido à liberação de ácidos orgânicos e consequente acidificação do meio, porém Altomare et al. (1999) não verificaram um aumento na presença desses ácidos nos testes realizados.

Hoyos-Carvajal et al. (2009), avaliaram a produção de metabólitos de 101 isolados de trichoderma da Colômbia, 20% foram capazes de produzir formas solúveis de fosfato de rocha fosfática, 8% das amostras avaliadas mostraram capacidade de produzir sideróforos consistentes para converter ferro a formas solúveis, 60% produziram ácido indol-3-acético (AIA) ou análogos a auxina. A produção de metabólitos é uma característica de isolados específicos, podendo variar muito entre as espécies. Assim, segundo os referidos autores, nem todas as substâncias produzidas pelos isolados avaliados se correlacionaram com a promoção do crescimento vegetal, sendo que, somente sete isolados aumentaram significativamente o crescimento das mudas de feijão.

Diante o exposto, diversos fatores podem afetar o potencial germinativo das sementes, prejudicando além da germinação, o desenvolvimento inicial das plântulas. Portanto, o estabelecimento de protocolos de germinação de sementes e testes de sanidade se faz necessário, além de metodologias alternativas que visem à promoção da germinação e do crescimento vegetal. Para isso é imprescindível conhecimento mais aprofundado por pesquisas envolvendo espécies nativas, tendo em vista a obtenção de mudas vigorosas e com qualidade para os mais diversos interesses.

CAPÍTULO II

TEMPERATURA, LUZ E ASSEPSIA NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E SANIDADE DOS DIÁSPOROS DE *Gochnatia polymorpha* (LESS.) CABRERA

RESUMO

Gochnatia polymorpha (cambará), espécie florestal nativa pertencente à família Asteraceae, é recomendada para recuperação de áreas degradadas, utilizada na medicina popular e sua madeira é usada para diversos fins. Devido à necessidade da obtenção de mudas para restauração florestal e para fins de exploração comercial se faz necessário o conhecimento da qualidade fisiológica e sanitária das sementes. Este trabalho objetivou avaliar a influência da temperatura, da luz e do hipoclorito de sódio (NaClO) na germinação das sementes e na contaminação dos diásporos de *G. polymorpha*, além de identificar os fungos associados aos diásporos. Para o teste de germinação, os diásporos previamente desinfestados em álcool 70% e NaClO 2%, foram submetidos às temperaturas constantes de 15°, 20°, 25° e 30°C em dois regimes de luz, fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo. O efeito do NaClO foi avaliado nas concentrações de 0, 1, 2, 3 e 4% em diásporos com e sem papus. Nos dois estudos os diásporos foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água, 0,7%, pH ajustado a $5,8 \pm 0,2$. Os métodos utilizados para o teste de sanidade foram o papel de filtro e o plaqueamento em meio de cultura BDA, em diásporos com e sem papus, na ausência e presença de assepsia com NaClO 1%. As sementes germinam tanto na presença quanto na ausência de luz, sendo que as temperaturas de 15° e 20°C são as mais adequadas, promovendo as maiores porcentagens (9,83 e 11,50%, respectivamente) e velocidade de germinação (0,187 e 0,354 no fotoperíodo de 16 horas; 0,248 e 0,247 no escuro contínuo). As diferentes concentrações de NaClO testadas não interferem na germinação das sementes, mas as menores médias de contaminação dos diásporos com papus são nas concentrações 0% (27%) e 4% (44%). Os diásporos sem papus apresentam as menores médias de contaminação nas concentrações 3, 4 e 0% (18, 13 e 21%, respectivamente). Os gêneros fúngicos identificados nos diásporos são *Bipolaris*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Aspergillus* e *Epicoccum*.

Palavras-chave: Espécie florestal. Espécie Nativa. Qualidade fisiológica. Qualidade sanitária. Desinfestação de diásporos.

2.1 Introdução

Devido à exploração dos recursos naturais, principalmente das espécies arbóreas, visando o uso da madeira e a abertura de novas áreas para a agricultura, as florestas nativas encontram-se fragmentadas e reduzidas a porções muito pequenas em relação às suas áreas originais. Dessa forma, visando programas de recuperação ambiental, a demanda por mudas florestais nativas tem sido crescente (REGO et al., 2009; VECHIATO, 2010).

Gochnatia polymorpha conhecida no Rio Grande do Sul por cambará, é uma espécie arbórea pertencente à família Asteraceae, nativa e com distribuição em vários estados brasileiros. A espécie proporciona madeira própria para obras imersas, construção civil e moirões. O tronco e as raízes produzem curvas para embarcações, carvão e lenha de boa qualidade. Apresenta características ornamentais, medicinais, sendo as folhas e cascas utilizadas na forma de chás para afecções bronco-pulmonares e as flores são melíferas (BACKES; IRGANG, 2002; LORENZI, 1998; STEFANELLO et al., 2006). Também é recomendada para arborização urbana e recuperação de ecossistemas degradados. Apresenta possibilidades para a conservação do solo, sendo indicada como planta fixadora de barrancas de rios e reposição de mata ciliar (CARVALHO, 1994; 2003; GLUFKE, 1999; JUNIOR et al., 2005; PIÑA-RODRIGUES et al., 2007).

Visto que, a maioria das espécies florestais nativas é propagada por sementes, o sucesso na formação de mudas depende do conhecimento do processo germinativo de cada espécie e da qualidade da semente utilizada (REGO et al., 2009). Nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), há metodologias definidas para testes de qualidade das espécies de alto valor comercial para o Brasil, mas as espécies florestais brasileiras representam 0,2%, dado inexpressivo diante da biodiversidade que compõe os biomas vegetais brasileiros (FIGLIOLIA et al., 2007; PIÑA-RODRIGUES et al., 2004).

A abertura de clareiras nas florestas altera a temperatura e os espectros de luz que atingem o solo, estimulando a germinação de sementes. No entanto, a germinação de algumas espécies é favorecida por temperaturas constantes e não é estimulada pela luz. Em razão disso, a influência destes fatores na germinação de sementes florestais tem sido estudada como uma forma de avaliar as condições ecológicas favoráveis ao processo germinativo em ambientes naturais (BRANCALION et al., 2008; NASSIF et al., 1998), principalmente de espécies com baixo poder germinativo, como *G. polymorpha* (CARVALHO, 2003).

A temperatura para a germinação pode ser expressa em mínima, máxima e ótima, sendo ótima aquela em que ocorre o máximo de germinação em tempo relativamente curto

(MACHADO et al., 2002). A temperatura adequada para a germinação de sementes arbóreas nativas vem sendo determinada por alguns pesquisadores. Como exemplo, foi determinado a temperatura de 25°C para angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) (MONDO et al., 2008), 30°C para canafístula (*Peltophorum dubium*) (OLIVEIRA et al., 2008), 25 a 35°C para ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) (MACHADO et al., 2002) e 20, 25, 35°C ou alternadas 20-30°C para barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (MARTINS et al., 2008).

Referente à sensibilidade luminosa, existe uma ampla variação nas respostas germinativas (FERREIRA, 2004; MENEZES et al., 2004; NASSIF et al., 1998). Há sementes que necessitam de luz para germinar, são as fotoblásticas positivas, a exemplo do guabiju (*Myrcianthes punges*) (SANTOS et al., 2004); espécies em que a germinação é inibida pela luz, são as fotoblásticas negativas, como o cravo-do-mato (*Tagetes minuta*) (FERREIRA et al., 2001); além de espécies que se apresentam indiferentes à luminosidade, são as fotoblásticas neutras ou não fotoblásticas, a exemplo da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (SILVA et al., 2002) e angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) (MONDO et al., 2008).

A associação de microrganismos às sementes também influencia na qualidade das mesmas (LUCCA FILHO, 1987). A presença de patógenos pode resultar na redução do potencial germinativo, vigor, emergência, período de armazenamento e rendimento (ARAÚJO; ROSSETTO, 1987; PEDROSO, 2009). Esses patógenos podem atacar não só a semente, mas também a plântula quando esta estiver emergindo do solo (DHINGRA et al., 1980). Além disso, as sementes infectadas podem disseminar agentes fitopatogênicos de uma região para outra, podendo contaminar áreas isentas de doenças (LAZAROTTO, 2010).

Vários microrganismos podem causar prejuízos às culturas quando associados às sementes, porém aos fungos deve ser dada maior atenção, considerando o grande número de espécies fitopatogênicas e por sua capacidade de sobreviver, nas condições de ambiente adequadas à manutenção da viabilidade das sementes, durante o período de armazenamento (CHEROBINI, 2006; KRUPPA; RUSSOMANNO, 2009).

Alguns trabalhos foram conduzidos, verificando-se a presença de fungos em sementes florestais. Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Cylindrocladium*, *Colletotrichum*, *Ulocladium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Mucor*, *Periconia*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Trichothecium*, dentre outros, foram detectados em sementes de espécies florestais, diminuindo a sua qualidade (BITENCOURT; HOMECHIN, 1998; MAGALHÃES et al., 2008; MUNIZ et al., 2007; MARTINELLI-SENEME, et al., 2006; PADULLA et al., 2010; SANTOS, et al., 2001).

Alguns gêneros são considerados potencialmente patogênicos às sementes florestais, como *Alternaria* e *Phoma* (VECHIATO, 2010).

A identificação de microrganismos em sementes florestais nativas é necessária, pois informações sobre a associação patógeno-semente envolvendo estas espécies são escassas e pouco estudadas (BOTELHO, et al., 2008; CAMARGO, 2007), além de ser a primeira etapa para avaliar os danos que podem causar às sementes e às mudas (BOTELHO et al., 2008), o que permite recomendar tratamentos específicos para organismos conhecidos por causar danos na espécie estudada (LAZAROTTO, 2010).

Em testes de germinação em laboratório, várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação superficial das sementes, visando reduzir a incidência de patógenos e promover a germinação. Os mais comuns são o etanol 70% e os compostos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio (NaClO). As concentrações das soluções desinfestantes variam bastante, de acordo com o tipo de semente e de patógeno, bem como dos produtos utilizados (WENDLING et al., 2006).

Diante o exposto, se faz necessário estudar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes florestais nativas em diferentes regiões, como contribuição para a padronização das normas e obtenção de informações para o cultivo de mudas. *G. polymorpha*, assim como outras espécies, tiveram suas populações naturais devastadas pela ação antrópica, sendo a conservação genética desta de suma importância, garantindo a preservação dos seus genes.

Tendo em vista que estudos de germinação de sementes florestais nativas merecem atenção, tanto para a preservação quanto para a utilização comercial, que as informações sobre a associação patógeno-sementes florestais nativas são escassas e existirem raros estudos com *G. polymorpha*, este trabalho objetivou avaliar a influência da temperatura, da luz e do hipoclorito de sódio (NaClO) na germinação das sementes e na contaminação dos diásporos, além de identificar os fungos associados aos diásporos.

2.2 Material e métodos

Os ensaios experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório de Interação Planta-Microrganismo pertencentes ao Departamento de Biologia, do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.

2.2.1 Material botânico

Foram coletados ramos com infrutescências de *G. polymorpha* em uma população natural no Distrito Boca do Monte no município de Santa Maria – RS (29° 41' 43,311''S 53° 48' 41,041''O). Realizaram-se duas coletas em 2010, sendo uma no mês de janeiro e a outra no mês de março; e uma coleta em 2011, no mês de janeiro, na mesma localidade. As infrutescências secaram aproximadamente em quatro dias a temperatura ambiente e, após foi realizada a extração manual dos diásporos (cipsela com papus), que foram armazenados sob refrigeração a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ até a implantação dos experimentos.

Duas exsiccatas foram incorporadas ao herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, uma proveniente da coleta realizada em janeiro de 2010 sob o número de registro SMDB – 12.944 e outra proveniente da coleta realizada em 2011 sob o número de registro SMDB – 13.139.

2.2.2 Determinação do grau de umidade

O teor de água dos diásporos, coletados em 2010 e 2011, foi determinado pelo método de estufa à alta temperatura (BRASIL, 2009). Utilizaram-se quatro amostras de 1 g de diásporos, colocados em estufa a uma temperatura de 105°C, com oscilações de $\pm 3^\circ\text{C}$, durante um período de 24 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido.

2.2.3 Experimentos preliminares: época de coleta, sistema de cultivo e diásporos com e sem papus na germinação das sementes de *G. polymorpha*

Foram realizados testes prévios, a fim de se determinar a influência da época de coleta, sistema de cultivo e a presença ou ausência de papus nos diásporos, na porcentagem total de germinação das sementes. Os tratamentos com as maiores médias foram utilizados no experimento em que se avaliou a influência da temperatura e da luz na qualidade fisiológica das sementes.

Com diásporos coletados em janeiro e março de 2010, separadamente, foram avaliadas combinações de dois fatores: sistema de cultivo (papel de filtro em caixas gerbox e meio de cultura ágar-água em placas de Petri) e presença ou ausência de papus, totalizando quatro tratamentos em cada experimento.

Os dois sistemas de cultivo constaram de caixas gerbox (11x11 cm), previamente esterilizadas com NaClO 10% e álcool 70%, forradas com três folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada e autoclavada, o equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco (BRASIL, 2009); e placas de Petri (9 cm de diâmetro) que continham cerca de 35 mL de meio de cultura ágar-água, ágar 0,7% e pH ajustado a $5,8 \pm 0,2$.

Uma parte dos diásporos passou por um processo de extração dos papus, o qual foi realizado manualmente com o auxílio de uma pinça.

Antes da instalação do experimento, em condições assépticas, tanto os diásporos com papus quanto os sem papus, passaram por um processo de desinfestação, que consistiu na imersão desses por um minuto em álcool 70%, 15 minutos em solução de NaClO 2%, acrescida de duas gotas de detergente líquido e uma lavagem em água destilada e autoclavada. Após a distribuição dos diásporos nos sistemas de cultivo, as parcelas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura ambiente.

As avaliações constaram da contagem das sementes germinadas, por 40 dias, a contar da instalação do experimento e o resultado foi expresso em porcentagem de germinação no final do teste. Como critério de avaliação, considerou-se semente germinada pela emissão da radícula, conforme Borghetti e Ferreira (2004).

Para cada experimento (coleta de janeiro e março) foram avaliados quatro tratamentos em um fatorial 2 x 2 (sistema de cultivo x presença e ausência de papus) conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento; cada parcela experimental constituída por 50 diásporos, totalizando 200 por tratamento.

2.2.4 Temperatura e luz na germinação *in vitro* das sementes de *G. polymorpha*

Neste experimento e nos demais, descritos a seguir, utilizaram-se diásporos provenientes da coleta realizada em janeiro de 2011.

Foram testadas combinações de quatro temperaturas (15, 20, 25 e 30°C) e dois regimes de luz (fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo). Utilizaram-se placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura ágar-água, ágar 0,7% e pH ajustado a $5,8 \pm 0,2$. Antes da instalação do experimento, em condições assépticas, os diásporos passaram por um processo de desinfestação, o qual consistiu da imersão por um minuto em álcool 70%, 15 minutos em solução de NaClO 2%, acrescida de duas gotas de detergente líquido e três lavagens em água destilada e autoclavada (WENDLING et al., 2006). As parcelas foram mantidas em câmaras climáticas do tipo Biosystem Organized Development (BOD) com

fotoperíodo de 16 horas, aquelas submetidas ao escuro contínuo foram cobertas com papel alumínio e mantidas nas mesmas câmaras.

As avaliações constaram da contagem das sementes germinadas, diariamente, por 30 dias, a contar da instalação do experimento. As parcelas mantidas sob o escuro contínuo foram avaliadas em sala escura com luz verde. O critério de avaliação considerado para a germinação foi a emissão da radícula (BORGHETTI; FERREIRA, 2004). Foram realizadas as seguintes análises:

Porcentagem de germinação: determinou-se aos 30 dias, através do número de sementes germinadas em relação ao número de diásporos colocados para germinar (BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

Primeira contagem de germinação: realizou-se aos 20 dias, os resultados foram expressos em porcentagem (NAKAGAVA, 1994).

Índice de velocidade de germinação (IVG): foi calculado o IVG somando-se o número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da sementeira, conforme Maguire (1962) (NAKAGAVA, 1994).

Porcentagem de diásporos contaminados: determinada aos 30 dias, através do número de diásporos contaminados por fungos em relação ao número colocado para germinar.

Foram avaliados oito tratamentos em um experimento fatorial 4 x 2 (temperaturas x regime de luz) conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento; cada parcela experimental constituída por 50 diásporos, totalizando 300 por tratamento.

2.2.5 Influência da assepsia com hipoclorito de sódio na germinação das sementes e na contaminação dos diásporos de *G. polymorpha*

Foram avaliadas cinco concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) (0, 1, 2, 3 e 4%) em diásporos com e sem papus. A assepsia constou da imersão dos diásporos por 1 minuto em álcool 70%, 15 minutos em solução de NaClO nas concentrações de 1, 2, 3 e 4% e três lavagens em água destilada e autoclavada.

Utilizaram-se placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura ágar-água 0,7% e pH ajustado a $5,8 \pm 0,2$. As parcelas foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As avaliações constaram da contagem das sementes germinadas e da contagem dos diásporos contaminados. O critério de avaliação considerado para a germinação foi a emissão da radícula (BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

Porcentagem de germinação: determinada aos 30 dias, através do número de sementes germinadas em relação ao número de diásporos colocados para germinar (BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

Porcentagem de diásporos contaminados: determinada aos 30 dias, através do número de diásporos contaminados por fungos em relação ao número disposto para germinar.

Foram avaliados dez tratamentos em um experimento fatorial 5 x 2 (concentrações de NaClO x presença e ausência de papus) conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento; cada parcela experimental constituída por 25 diásporos, totalizando 100 por tratamento.

2.2.6 Análise estatística

Os dados em porcentagem, quando necessário, foram transformados para o arcoseno da raiz quadrada, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico Assistat 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). Os dados que não atenderam as pressuposições de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias foram submetidos ao procedimento de transformação Box Cox antes da ANOVA, e quando necessário foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis pelo programa estatístico Action 2.2.

2.2.7 Identificação dos fungos associados aos diásporos de *G. polymorpha*

Para avaliar a qualidade sanitária dos diásporos foi realizado um experimento fatorial 2 x 2 x 2 (método papel de filtro e plaqueamento em meio ágar sólido x diásporos com e sem papus x ausência e presença da assepsia com NaClO 1%).

No método papel de filtro utilizaram-se caixas plásticas tipo gerbox (11 x 11 cm) com três folhas de papel de filtro esterilizadas em autoclave (120°/40 minutos) umedecidas com água destilada e esterilizada, equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. No método de plaqueamento em meio ágar sólido, utilizou-se meio de cultura BDA (200g de batata, 20g de dextrose, 15g de ágar e 1000 mL de água destilada).

Nos tratamentos em que se utilizaram diásporos sem papus, estes foram extraídos manualmente com o auxílio de uma pinça. Nos tratamentos com presença de assepsia, os diásporos foram imersos por 1 minuto em álcool 70%, posteriormente em solução de NaClO

1% por 10 minutos e três lavagens em água destilada e autoclavada (HENNING, 2005; PIÑARODRIGUES et al., 2004).

As parcelas foram incubadas durante oito dias a 25°C, em um regime alternado de luz (12 horas luz e 12 horas escuro). Decorrido o período de incubação, procedeu-se a avaliação. Nos tratamentos pelo método do papel de filtro, a incidência de cada contaminante foi verificada por diásporo. Nos tratamentos pelo método de plaqueamento em meio de cultura BDA, a incidência foi analisada pelo exame macroscópico e contagem do número de colônias formadas pelos fungos (CARNEIRO, 1987). Em ambos os métodos realizou-se o isolamento dos fungos em meio de cultura BDA. A identificação foi feita pela confecção de lâminas e observação das estruturas fúngicas em microscópio óptico comparando com as características descritas em literatura específica (BARNETT; HUNTER, 2006).

Foram avaliados oito tratamentos dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento; cada parcela experimental constituída por 25 diásporos, totalizando 200 por tratamento. Foram calculadas as médias em porcentagem das parcelas e essas foram submetidas à análise descritiva.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Determinação do grau de umidade

Na Tabela 1 encontram-se os resultados do teor de água dos diásporos de *G. polymorpha*, determinados antes da implantação dos experimentos. Os valores variaram de 7,23 a 12,98% entre os lotes. Segundo Botelho (2006), a determinação do conteúdo de água nas sementes pode fornecer informações para preservar suas qualidades fisiológicas e sanitárias durante um determinado período de armazenamento.

Tabela 1 – Médias do grau de umidade dos diásporos de *Gochnatia polymorpha* coletados em 2010 e 2011 no distrito Boca do Monte. Santa Maria – RS (2011).

Amostras	Grau de umidade (%)
Janeiro de 2010	7,77
Março de 2010	12,98
Janeiro de 2011	7,23

A determinação do grau de umidade de sementes vem sendo realizada por alguns pesquisadores, permitindo classificá-las em ortodoxas ou recalcitrantes (LIMA JUNIOR, 2010). As ortodoxas são tolerantes à perda de 90 a 95% de água durante o desenvolvimento e à dessecação, já as recalcitrantes, não toleram a dessecação na maturidade e, em geral, têm períodos de vida muito limitados no armazenamento (CASTRO et al., 2004b).

Melo et al. (2007), pesquisando o desempenho germinativo de diásporos de arnica (*Lychnophora pinaster* – Asteraceae), verificaram que o grau de umidade apresentado foi entre 9 e 13%. Nóbrega et al. (1995), determinaram 14,1 a 15%, o grau de umidade em diásporos de camomila (*Matricaria recutita* - Asteraceae). Não foram encontrados relatos do grau de umidade em diásporos de *G. polymorpha* que permitam relacionar aos resultados obtidos, entretanto, Wielewicki et al. (2006), realizaram uma análise em dados de pesquisa do teor de água de sementes de 27 espécies florestais nativas do sul do Brasil e estabeleceram que 21 das espécies estudadas apresentaram comportamento ortodoxo e teor de água médio entre 6,6 e 19,8%, o que permite sugerir que diásporos de *G. polymorpha* são ortodoxos e o grau de umidade obtido está de acordo com a média encontrada em espécies relacionadas.

2.3.2 Experimentos preliminares: época de coleta, sistema de cultivo e diásporos com e sem papus na germinação das sementes de *G. polymorpha*

Os resultados da Tabela 2 referem-se à germinação das sementes provenientes dos diásporos coletados em janeiro de 2010 e demonstram que os tratamentos em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água apresentaram maior média de germinação em relação ao papel de filtro em caixas gerbox, diferindo estatisticamente. Além disso, sementes provenientes de diásporos com papus, apresentaram maior média de germinação em relação às provenientes dos diásporos sem papus.

A germinação das sementes provenientes dos diásporos coletados em março de 2010, foi praticamente nula (0,75% - dados não demonstrados), por este motivo não foi realizada análise estatística. Assim, os diásporos coletados em janeiro, quando os frutos estavam imaturos por apresentarem coloração verde, proporcionaram maior média de germinação em relação aos coletados em março, quando os frutos estavam maduros, com coloração marrom e em plena dispersão anemocórica.

Tabela 2 – Germinação das sementes de *Gochnatia polymorpha* em dois sistemas de cultivo, na presença e ausência de papus nos diásporos, coletados em janeiro de 2010. Santa Maria - RS (2011).

Sistema de cultivo	Germinação (%)
Papel de filtro em gerbox	18,75 b*
Agar-água em placas de Petri	24,50 a
Tipo de diásporos	Germinação (%)
Com papus	32,00 a
Sem papus	11,25 b
CV %	23,62

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Esse resultado está de acordo com Figliolia e Piña-Rodrigues (1995), os quais dizem que a maturação da semente é um processo que pode ocorrer independentemente da maturação do fruto. Muitas vezes, a coleta de sementes utilizando como padrão a modificação da cor do fruto verde para marrom, por exemplo, não indica necessariamente que a semente esteja no seu potencial máximo germinativo. A exemplo do angico (*Anadenanthera falcata*), em que o índice de maturação se dá quando os frutos estão verde-amarronzados, além de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e jacarandá (*Dalbergia nigra*), em que o índice de maturação das sementes se dá com os frutos ainda de cor verde.

Segundo Piña-Rodrigues et al. (2007), a obtenção de sementes de boa qualidade depende da coleta em época adequada, evitando a deterioração acelerada que ocorre durante a sua permanência no campo, sujeita a predação e oscilações de temperatura e umidade. No entanto, as determinações de índices de maturação, geralmente são efetuadas com base em conhecimentos empíricos e são poucas as pesquisas com a finalidade de obter índices baseados na obtenção de sementes em sua máxima capacidade germinativa e vigor. Conforme os autores, em sementes florestais no domínio da Mata Atlântica, os temas maturação, patologia, fenologia e colheita apresentam o menor percentual de pesquisa, menos de 1,3%.

Conforme Carvalho (2003), no Rio Grande do Sul, os frutos de *G. polymorpha* amadurecem de abril a maio, entretanto, Lorenzi (1998), menciona que a maturação ocorre de dezembro a fevereiro. Baseado na oposição das informações disponíveis na literatura, os experimentos preliminares visaram determinar apenas, entre duas épocas de coleta, janeiro e março, a que apresentaria maior poder germinativo para dar sequência aos demais experimentos. Contudo, de acordo com os resultados obtidos, verifica-se a necessidade de

pesquisas baseadas em parâmetros morfo-fisiológicos que definam o índice de maturidade das sementes dessa espécie.

Quanto ao sistema de cultivo, ágar-água em placas de Petri proporcionou maior média de germinação em relação ao papel de filtro em caixas gerbox. Esse resultado pode ser devido às variações que estavam expostas as caixas gerbox, devido à adição de água para o umedecimento do substrato a cada quatro ou cinco dias, o que pode ter ocasionado oscilações de temperatura, contaminação por microrganismos e falta ou excesso de umidade.

O substrato deve ser, durante todo o teste de germinação, suficientemente úmido a fim de dar às sementes a quantidade de água necessária para a sua germinação, sendo que a adição de água deve ser evitada sempre que possível, pois aumenta a variação entre as repetições (BRASIL, 2009). Essa recomendação das RAS dificulta o teste de germinação de *G. polymorpha*, em laboratório, utilizando como substrato o papel de filtro, pois a germinação iniciou oito dias após a instalação do experimento e apresentou-se de forma lenta, exigindo a adição de água constantemente no substrato. O teste teve duração de 40 dias e observou-se germinação até o 35º dia. Embora nos últimos 10 dias tenha germinado apenas 0,40%, a duração do teste deve ser no mínimo 30 dias, o que exige a adição de água.

De acordo com Ferreira (2004), o ágar é uma possibilidade para o teste de germinação em laboratório, pois evita a falta ou excesso de água, mantendo uma proporção adequada. Ferreira et al. (2001), utilizaram ágar em testes de germinação com diásporos de Asteraceae nativas do Rio Grande do Sul; Rosa e Ferreira (2001) utilizaram ágar, em estudos de germinação de plantas medicinais lenhosas; Abreu et al. (2005), também utilizaram esse substrato para a germinação de sementes de cataia (*Drimys brasiliensis*). Além disso, uma vantagem em se utilizar meio de cultura é o estabelecimento de protocolos de germinação de sementes *in vitro* para a micropropagação de plantas, tendo em vista a obtenção de plântulas assépticas como fonte de explantes.

As sementes provenientes dos diásporos sem papus germinaram menos do que as provenientes de diásporos com papus (Tabela 2). Isso pode ter sido consequência de algum dano ocorrido no embrião da semente, devido a resíduos de NaClO utilizado na assepsia. Em testes de laboratório é reconhecida a utilização de produtos que visem à eliminação ou diminuição de contaminantes nas sementes. Conforme Wendling et al. (2006), várias substâncias com ação germicida são utilizadas, sendo o etanol e o NaClO, os mais comuns. Neste estudo, após a imersão dos diásporos por 1 minuto em álcool 70% e 15 minutos em NaClO 2%, realizou-se apenas uma lavagem em água destilada autoclavada, no entanto,

segundo Wendling et al. (2006), após a desinfestação, procede-se, geralmente, três lavagens com água destilada autoclavada para remoção dos resíduos de cloro.

De acordo com Dhingra et al. (1980), o produto químico utilizado no tratamento de sementes poderá causar fitotoxicidade e os sintomas podem ser manifestados pelo impedimento ou redução na germinação, sendo determinantes os procedimentos como dosagem do produto, tipo de semente, espécie do patógeno, método de aplicação, dentre outros. Dessa forma, acredita-se que resíduos de NaClO possam ter danificado o embrião e reduzido a germinação, com a remoção dos papus associada a somente uma lavagem após a desinfestação.

2.3.3 Temperatura e luz na germinação *in vitro* das sementes de *G. polymorpha*

As médias de germinação encontram-se na Tabela 3, na qual se verifica que não houve interação entre os fatores temperatura e luz. Observou-se que a luz não apresentou efeito significativo, entretanto, a temperatura influenciou o desempenho germinativo das sementes, sendo a germinação sob 15° e 20°C superiores a 25° e 30°C.

Tabela 3 – Germinação das sementes de *Gochnatia polymorpha*, submetidas a diferentes temperaturas. Santa Maria - RS (2011).

Temperatura	Germinação (%)
15° C	9,83 a*
20° C	11,50 a
25° C	4,17 b
30° C	2,50 b
CV%	36,42

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Mesmo com a ocorrência de germinação em todas as temperaturas testadas, os maiores percentuais foram estatisticamente equivalentes a 15° e 20°C, no entanto, observou-se que a média diminuiu conforme aumentou a temperatura e a média de germinação a 15°C foi inferior a 20°C. Esses resultados sugerem que a temperatura ótima para a germinação dessa espécie é entre 15° e 20°C e estão de acordo com Carvalho e Nakagawa (1988), temperaturas superiores ou inferiores à ótima tendem a reduzir a velocidade do processo germinativo, o que pode levar à redução no total da germinação.

Na análise da primeira contagem de germinação (Tabela 4), observou-se que a temperatura de 20°C associada ao fotoperíodo de 16 horas proporcionou a maior média de germinação, não diferindo estatisticamente de 20°C no escuro contínuo, bem como de 15°C no fotoperíodo e no escuro contínuo e de 25°C no fotoperíodo de 16 horas.

Tabela 4 – Primeira contagem de germinação das sementes de *Gochnatia polymorpha*, submetidas a diferentes temperaturas, na ausência e presença de luz. Santa Maria - RS (2011).

Tratamentos	Primeira contagem de germinação (%)
20°/Fotoperíodo 16 horas	8,00 a*
25°/Fotoperíodo 16 horas	4,00 abc
15°/Escuro contínuo	3,33 abc
20°/Escuro contínuo	2,00 abc
15°/Fotoperíodo 16 horas	1,00 abc
30°/Fotoperíodo 16 horas	0,33 bc
25°/Escuro contínuo	0,00 bc
30°/Escuro contínuo	0,00 c

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Embora a temperatura de 25°C no fotoperíodo de 16 horas não tenha diferido da maior média obtida, 20°C no fotoperíodo de 16 horas, a primeira contagem de germinação objetiva determinar o vigor relativo de um lote e é complementar a outros testes de vigor e ao teste de germinação (NAKAGAWA, 1994; VIEIRA et al., 1994). Para os resultados de contagem final, as temperaturas de 15° e 20°C foram as mais adequadas para a germinação dessa espécie. Verificou-se, já na análise da primeira contagem, que as temperaturas de 25°C no escuro contínuo e 30°C, tanto na presença quanto na ausência de luz, prejudicaram o desempenho germinativo das sementes.

Assumindo que as sementes correspondem a um conjunto organizado de células cujo metabolismo depende essencialmente da atividade acoplada de diversas enzimas, seria esperado que, em determinadas temperaturas, a inativação de proteínas ocasionada por temperaturas extremas resultaria em um descompasso metabólico que comprometeria a germinação (MARCOS FILHO, 2005), isso pode, possivelmente, explicar a redução no percentual germinativo das sementes de *G. polymorpha* submetidas a 25° e 30°C.

Quanto ao índice de velocidade de germinação (IVG) verificou-se na Tabela 5 que houve interação significativa entre os dois fatores avaliados e que em ambos os regimes de luz, o IVG indicou que o processo germinativo foi mais rápido nas temperaturas de 15° e 20°C, confirmando os resultados de germinação total.

Tabela 5 – Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de contaminação por fungos em diásporos de *Gochnatia polymorpha*, submetidos a diferentes temperaturas, na ausência e presença de luz. Santa Maria - RS (2011).

Temperatura	Fotoperíodo 16 horas		Escuro contínuo	
	IVG	Contaminação (%)	IVG	Contaminação (%)
15°C	0,187 abA*	90,67 aA	0,248 aA	88,33 abA
20°C	0,354 aA	94,00 aA	0,247 aA	92,33 aA
25°C	0,162 bA	90,00 aA	0,065 bA	92,33 aA
30°C	0,022 cA	91,00 aA	0,093 bA	79,67 bB
CV%	32,72	6,95	32,72	6,95

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação aos tratamentos submetidos ao fotoperíodo de 16 horas, 15°C foi estatisticamente equivalente a 20°C, porém a 15°C houve uma redução na velocidade e na porcentagem de germinação. A 25°C, a germinação ocorreu mais cedo, no 10° dia após a instalação do experimento, em relação a 15° e 20°C, que ocorreram no 19° e 13° dia, respectivamente, entretanto, a 25°C a germinação foi lenta e baixa. A 30°C, a primeira germinação foi registrada no 19° dia, sendo este o tratamento que obteve o menor índice de velocidade. No escuro contínuo, 15° e 20°C, obtiveram os primeiros registros de germinação aos 14 e 16 dias do teste, respectivamente, diferindo de 25° e 30°C, onde a primeira germinação foi registrada aos 22 e aos 21 dias, respectivamente.

Esses resultados evidenciaram que as temperaturas de 15° e 20°C, tanto no fotoperíodo de 16 horas, quanto no escuro contínuo, aceleraram o processo germinativo, além de terem promovido as maiores médias de germinação. Tal fato confirma a declaração de Carvalho e Nakagawa (1988), de que, na germinação de sementes, a temperatura influencia tanto a velocidade quanto a uniformidade e a germinação total de sementes.

Resultados semelhantes foram encontrados por Abreu et al. (2005), em estudos com cataia (*Drimys brasiliensis*), em que a temperatura constante de 17°C proporcionou maiores

porcentagens e valores de velocidade de germinação, sendo as temperaturas de 25° e 30°C inadequadas para a germinação de sementes dessa espécie. Gomes e Fernandes (2002) determinaram a temperatura de 15°C, tanto na presença quanto na ausência de luz, e ainda, 20°C na presença de luz, como temperaturas ótimas para a germinação de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), espécie arbustiva pertencente à família Asteraceae.

Os resultados encontrados por Gomes e Fernandes (2002) para alecrim-do-campo em relação à sensibilidade luminosa estão de acordo com a resposta de *G. polymorpha*. Os regimes de luz estudados, fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo, não resultaram em diferenças estatísticas significativas na germinação. Isso demonstra que sementes de *G. polymorpha*, embora apresentem baixa porcentagem de germinação, germinam tanto na presença quanto na ausência de luz, podendo ser, esta espécie, classificada como fotoblástica neutra, de acordo com Mondo et al. (2008).

A indiferença à luz já foi observada em estudos com espécies florestais nativas. Silva et al. (2002), relataram que sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) germinam tanto na presença quanto na ausência de luz. Esse resultado também foi encontrado por Mondo et al. (2008) para angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*), por Rego et al. (2009) para murta (*Blepharocalyx salicifolius*) e por Santos et al. (2005) para três espécies de ipês, *Tabebuia serratifolia*, *T. chrysotricha* e *T. roseo-alba*.

Conforme Nassif et al. (1998), o requerimento de luz para germinação é fortemente influenciado pela temperatura e, em geral, os dois fatores não têm ação independente sobre a germinação de sementes, sendo que a temperatura exerce um importante papel na germinação de sementes fotossensíveis. No caso de *G. polymorpha* em que a germinação ocorre preferencialmente em temperaturas mais baixas, a ausência de luz não demonstrou ser um fator limitante no processo.

A Tabela 5 também mostra os resultados de contaminação dos diásporos por fungos, no final do teste, aos 30 dias. No fotoperíodo de 16 horas, observou-se que cerca de 91% dos diásporos estavam contaminados e não houve diferença significativa entre as temperaturas testadas. No escuro contínuo, na temperatura de 30°C, a média de contaminação (79,67%) foi inferior às médias das demais temperaturas testadas (88,33; 92,33 e 92,33%), diferindo estatisticamente; no entanto, também representa uma média elevada de contaminação.

Nas regiões tropicais, a umidade e a temperatura elevadas são favoráveis ao desenvolvimento de patógenos, fazendo com que as sementes nativas tornem-se vulneráveis ao ataque dos mesmos (NASCIMENTO et al., 2006). A associação de fungos com sementes pode ocorrer pela contaminação superficial ou por colonização dos tecidos internos

(DHINGRA et al., 1980). A infecção dos tecidos internos pode ocorrer por agentes externos ou diretamente por agentes infectantes da planta-mãe. A infecção por patógenos do ambiente externo tem como agentes o evento, água, insetos ou a própria semente, durante a coleta e o beneficiamento. Diretamente a partir da planta-mãe, a infecção pode ocorrer através do pedúnculo de flores, frutos ou semente, ou ainda, pela superfície íntegra da semente (MENTEN; BUENO, 1987).

Segundo Menten e Bueno (1987), a presença de patógenos em sementes mantém íntima relação com sua formação e estrutura, pois existe grande variação nos detalhes morfológicos e anatômicos entre diferentes espécies. A cavidade de alguns tipos de frutos pode atuar como câmara úmida, proporcionando o estabelecimento e desenvolvimento de fungos dentro do fruto, afetando as sementes. Assim, o estabelecimento do inóculo depende das condições ambientais que o favorecem desde o desenvolvimento do óvulo até a maturação da semente.

De maneira geral, as sementes de essências florestais apresentam, de acordo com Vechiato (2010), baixas porcentagens de germinação, pois, dentre outros fatores, a presença de microrganismos pode causar deterioração das sementes, assim como anormalidades e lesões nas plântulas. No caso de *G. polymorpha*, não se sabe, com os dados obtidos nesse experimento, se os fungos presentes são patogênicos e prejudicam a germinação, mas observou-se nos resultados que a germinação foi baixa e a incidência de fungos foi alta.

Por outro lado, observou-se nos experimentos preliminares realizados com diásporos coletados em 2010, que a contaminação por fungos foi inferior em relação aos diásporos coletados em 2011. Embora os dados de 2010 não tenham sido quantificados, concluiu-se na ocasião, que a desinfestação com NaClO 2% havia sido suficiente para o controle de fungos. Além disso, a germinação do lote janeiro de 2010 foi superior. Acredita-se, portanto, que pode haver diferenças na germinação das sementes e na contaminação dos diásporos em diferentes anos de coleta que podem estar relacionadas à variações ambientais. Dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2010; 2011) mostram que no período de outubro/2009 a janeiro/2010, a ocorrência de chuvas foi acima da normal climatológica na Região Sul; já no mesmo período de 2010/2011, a ocorrência de chuvas foi abaixo e as temperaturas acima da normal climatológica na Região.

Sabe-se que a história da planta-mãe, com as limitações que ocorrem durante a formação e o amadurecimento da semente, pode alterar a qualidade e o sucesso da germinação, podendo, inclusive, produzir menos sementes (FERREIRA, 2004). Além de microrganismos, oscilações de temperatura, estresse hídrico, vento e nutrientes também

podem interferir no processo de formação da semente, refletindo na qualidade fisiológica e sanitária. Oliveira et al. (2005), concluíram que a resposta da germinação do ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), em relação ao regime de luz, variou conforme o ano de coleta.

Não obstante, segundo Marzinek (2008), trabalhos têm registrado a não ou baixa formação de sementes na família Asteraceae, algumas espécies não produzem sementes viáveis, em outras, a maior parte das cipselas não contem sementes em seu interior. Tal fato pode ocorrer devido a fatores como falha na fecundação, na formação do embrião, no desenvolvimento do endosperma, além de problemas decorrentes da contaminação por microrganismos. *G. polymorpha* (Asteraceae) floresce e frutifica anualmente e está sujeita a todos os fatores citados, podendo estes, terem contribuído na diferença observada na germinação das sementes e na contaminação dos diásporos coletados em 2010 e em 2011.

2.3.4 Influência da assepsia com hipoclorito de sódio na germinação das sementes e na contaminação dos diásporos de *G. polymorpha*

Observa-se na Tabela 6, que para os dados de germinação, não houve interação entre os dois fatores avaliados, concentração de NaClO e presença ou ausência de papus. As diferentes concentração de NaClO testadas, também não resultaram em efeito significativo na germinação. Observou-se significância apenas em relação à presença e ausência do papus.

Tabela 6 – Germinação das sementes de *Gochnatia polymorpha* provenientes de diásporos com e sem papus, submetidos à assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO). Santa Maria - RS (2011).

Concentrações de NaClO	Germinação (%)
1%	11,50 a*
2%	12,00 a
3%	5,00 a
4%	15,00 a
0%	16,50 a
Tipo de diásporos	Germinação (%)
Com papus	8,00 b
Sem papus	16,00 a
CV%	49,77

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos para a germinação das sementes provenientes dos diásporos submetidos a diferentes concentrações de NaClO diferem daqueles encontrados por Muniz et al. (2007), os quais verificaram que o tratamento de sementes com NaClO 1% influenciou na germinação de canafístula e timbaúva (*Peltophorum dubium* e *Enterolobium contortisiliquum*) com diferença significativa para as sementes tratadas; entretanto, é preciso considerar, principalmente, o tipo de patógeno e da associação deste com a semente, se é interna ou externamente, para relacionar resultados.

Nesse experimento não foram identificados os fungos contaminantes de *G. polymorpha*, mas observou-se que a média de germinação em diásporos sem papus foi superior a dos diásporos com papus (Tabela 6). Esse resultado demonstra que os fungos podem ter interferido na germinação, já que os tratamentos sem papus obtiveram médias menores de contaminação, conforme a Tabela 7. Essa tabela mostra os resultados de contaminação dos diásporos, onde se verificou, nas concentrações 1, 3 e 4%, que nos tratamentos sem papus as médias foram inferiores às com papus, diferindo estatisticamente.

Observou-se que mesmo sem papus, as médias de contaminações dos diásporos foram altas. Assim, possivelmente, os fungos presentes nos diásporos de *G. polymorpha* não são contaminantes da superfície externa dos diásporos, mas sim, endofíticos, fungos que colonizam os tecidos internos, segundo Machado (1988), a semente nessa condição é considerada infectada.

Tabela 7 – Contaminação por fungos nos diásporos com e sem papus de *Gochmatia polymorpha*, submetidos à assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO). Santa Maria - RS (2011).

Concentrações de NaClO	Contaminação (%)	
	Com papus	Sem papus
1%	70,00 aA*	39,00 abB
2%	64,00 abA	55,00 aA
3%	59,00 abA	18,00 bcB
4%	44,00 bcA	13,00 cB
0%	27,00 cA	21,00 bcA
CV%	28,85	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme Dhingra et al. (1980), quando a associação do fungo com a semente é superficial, sem infectá-la, é relativamente fácil de ser controlado pelo tratamento das sementes, sendo que, o NaClO vem mostrando grande eficiência na desinfestação, eliminando fungos e bactérias (NASCIMENTO et al., 2007). O maior desafio do controle de patógenos é constituído por aqueles que sobrevivem internamente, pois ficam protegidos contra a maioria dos tratamentos. Nestes casos, o patógeno poderá estar presente em qualquer parte da semente, na casca, no endosperma e/ou no embrião, onde se apresentam sob a forma de micélio dormente (DHINGRA et al., 1980).

Outro fator que deve ser considerado, é em relação à dosagem do produto químico, que segundo Dhingra et al. (1980), é um ponto determinante no sucesso do tratamento de sementes. As dosagens variam, em função do tipo de semente, do produto químico, do tipo do inóculo e com o método utilizado, sendo que concentrações baixas poderão não propiciar bom controle, enquanto concentrações altas poderão causar fitotoxicidade, neste caso, os sintomas podem ser manifestados pelo impedimento ou redução na germinação.

Nesse experimento, testaram-se desde a concentração zero até 4% de NaClO e observou-se que as concentrações testadas não apresentaram efeito na germinação. Quanto à contaminação, analisando os tratamentos com papus, observou-se que nas concentrações 1, 2 e 3% a média não diferiu significativamente, no entanto, reduziu conforme aumentava a concentração, sendo que, o tratamento sem assepsia, na concentração 0%, foi o que obteve a menor média de contaminação. Nos tratamentos sem papus, as médias das concentrações 1 e 2% não diferiram, assim como não diferiram as médias das concentrações 3, 4 e 0%.

O fato de a menor média de contaminação ter sido no tratamento sem assepsia, pode ser atribuído à flora saprofítica normal na superfície das sementes, a qual interfere com a atividade de certos patógenos que as atacam. Quando um saprófita superficial é removido, os patógenos presentes no tegumento podem crescer sem competidores. A produção de substâncias antibióticas no tegumento das sementes parece ser o mecanismo pelo qual os antagonistas controlam os patógenos de sementes (DHINGRA, et al., 1980). As médias dos tratamentos sem papus, nas concentrações 3 e 4 % que não diferiram do tratamento sem assepsia, pode ser em decorrência que, nas concentrações mais elevadas de NaClO foi possível reduzir a incidência também dos patógenos.

2.3.5 Identificação dos fungos associados aos diásporos de *G. polymorpha*

Na Tabela 8 encontram-se os gêneros fúngicos detectados e suas incidências, por meio dos métodos papel de filtro e plaqueamento em meio de cultura BDA, em diásporos com e sem papus, na ausência e presença de assepsia com NaClO 1%. Foram identificados seis gêneros fúngicos associados aos diásporos de *G. polymorpha* e também se observou a presença de fungos que não foram identificados.

Tabela 8 – Fungos associados aos diásporos de *Gochnatia polymorpha*, detectados pelos métodos de papel de filtro e plaqueamento em meio de cultura BDA, na presença e ausência de papus, não submetidos à assepsia com NaClO 1% (S/A) e submetidos à assepsia (C/A). Santa Maria - RS (2011).

Gêneros de Fungos	Incidência (%)								Média
	PAPEL DE FILTRO				BDA				
	Com papus		Sem papus		Com papus		Sem papus		
	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	
<i>Bipolaris</i>	71,00	5,00	19,00	1,00	21,00	7,50	24,00	2,00	18,81
<i>Alternaria</i>	0,50	2,50	34,00	0	29,50	5,00	23,00	0	11,81
<i>Aspergillus</i>	1,50	0	0	0	17,00	0	8,00	0	3,31
<i>Cladosporium</i>	0	0	0	0	3,50	3,50	1,00	0	1,00
<i>Phoma</i>	0	0	0	0	1,50	0,50	2,50	0	0,56
<i>Epicoccum</i>	0	0	0	0	0	0	2,50	0	0,31
FNI*	1,50	0	0,50	0,50	27,00	11,00	26,00	0,50	8,37
Média	10,64	1,07	7,64	0,21	14,64	4,14	13,07	0,64	

*FNI = fungos não identificados

Os gêneros fúngicos com maior ocorrência foram *Bipolaris* e *Alternaria* com incidência média de 18,81% e 11,81%, respectivamente. Ambos foram detectados em diásporos com e sem papus, pelos dois métodos de identificação avaliados. A assepsia reduziu a média de contaminação por estes fungos, sem, entretanto, eliminar completamente o patógeno. No tratamento de diásporos com papus sem assepsia, *Bipolaris* teve uma incidência de 71%. De acordo com Kruppa e Russomanno (2009), os gêneros *Bipolaris* e *Alternaria* possuem espécies que podem causar importantes doenças. *Alternaria* é um possível patógeno para essências florestais (CARNEIRO, 1987).

Pelo método do papel de filtro, em diásporos com papus, também foi detectado o gênero *Aspergillus* e a assepsia o eliminou completamente. Pelo método de plaqueamento em meio de cultura BDA, a incidência do gênero foi mais alta e foi também detectado em diásporos sem papus. Conforme Vechiato (2010), *Aspergillus* faz parte de um grupo de fungos denominado fungos de armazenamento que podem invadir a semente e causar podridão e deterioração das mesmas. Espécies desse gênero podem estar presentes como contaminantes ou sob a forma de micélio dormente, uma vez que sobrevivem nas sementes mesmo com baixos teores de umidade.

Pelo método de plaqueamento em meio BDA foi possível detectar também os gêneros *Cladosporium*, *Phoma* e *Epicoccum*. *Cladosporium* e *Phoma* foram encontrados em diásporos com e sem papus, mas na presença de papus a assepsia não foi tão eficiente, reduzindo de 1,5% para 0,5% a incidência de *Phoma* e mantendo em 3,5% a incidência de *Cladosporium*. Na ausência de papus, a assepsia eliminou completamente estes fungos, no entanto, a incidência havia sido baixa, 1% para *Cladosporium* e 2,5% para *Phoma*. Conforme Vechiato (2010), *Cladosporium* quando detectado em alta incidência pode reduzir o poder germinativo das sementes, e *Phoma* possui espécies que podem causar doenças (KRUPPA; RUSSOMANNO, 2009). Em sementes florestais, *Cladosporium* e *Phoma* são possíveis patógenos, pois podem causar podridão nas sementes ainda no campo (ARAÚJO; ROSSETTO, 1987; CARNEIRO, 1987).

Em menor incidência foi detectado pelo método do plaqueamento em BDA, o gênero *Epicoccum*, que com a assepsia foi completamente eliminado. Segundo Vechiato (2010), esse gênero é saprófita e comumente encontrado em sementes submetidas ao teste de sanidade. Carneiro (1987), avaliando a sanidade de 17 espécies florestais também detectou esse gênero somente em meio de cultura BDA.

Os resultados encontrados para o método de análise estão de acordo com os obtidos por Magalhães et al. (2008), em que o meio de cultura BDA foi superior ao método do papel de filtro para o levantamento da micro flora de sementes de coquinho azedo (*Butia capitata*). Segundo os autores, o meio BDA é rico em nutrientes, ao contrário do papel de filtro, e isso provavelmente favoreceu o crescimento de alguns fungos. Pelo método do plaqueamento em meio BDA, tanto na presença quanto na ausência de papus e assepsia, também foi detectado uma baixa incidência (média inferior a 3%) de bactérias que não foram identificadas.

Em testes de sanidade de sementes de quaruba (*Vochysia máxima*) e ipê (*Tabebuia* sp.) Carneiro (1987), retirou as expansões aliformes das sementes para diminuir a porcentagem de contaminantes superficiais. Uma característica de *G. polymorpha* é o papus, uma estrutura

com relevante papel na dispersão do fruto e com importância taxonômica (MARZINEK, 2008). O papus poderia ter relação com a presença e incidência de determinados fungos e igualmente aos resultados obtidos por Carneiro (1987), *Epicoccum* só foi detectado em diásporos sem papus. O fungo teve um crescimento lento em cultura, portanto, acredita-se que o rápido crescimento de outros fungos tenha impedido a sua detecção em outros tratamentos.

Por outro lado, verificou-se que, os dois fungos com maior ocorrência, *Bipolaris* e *Alternaria*, em tratamentos sem assepsia, tiveram uma incidência média similar na presença e ausência de papus, o que indica que essa estrutura não teve influência na detecção dos dois principais fungos detectados, e que, possivelmente, estejam associados internamente às sementes. Segundo Machado (1988), em diversos hospedeiros, *Alternaria* e *Bipolaris* são fungos associados no interior das sementes.

O tratamento prévio da semente com NaClO visa eliminar fungos saprófitos que possam competir com os patógenos e mascarar os resultados. O tratamento deve ser suficiente para diminuir os saprófitos, sem, contudo, reduzir o inóculo dos patógenos (CARNEIRO, 1987). Neste estudo, a ação germicida do NaClO foi eficiente no controle de *Aspergillus* e *Epicoccum* considerados contaminantes de sementes.

Com exceção de *Bipolaris*, os fungos detectados, pela primeira vez, em *G. polymorpha*, já foram encontrados em outras espécies florestais. Botelho et al. (2008), identificaram, entre outros gêneros, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma* e *Epicoccum* em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*T. impetiginosa*). Com exceção do *Epicoccum*, Nascimento et al., (2006), detectaram estes gêneros em sementes de amendoim-bravo (*Pterogyne nitens*). *Alternaria* e *Aspergillus* foram detectados em acácia (*Cassia multijuga*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*), canafístula (*Peltophorum dubium*), timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) e maricá (*Mimosa bimucronata*) por Muniz et al. (2007).

Com relação à *Bipolaris*, existem poucos relatos sobre a ocorrência deste gênero em sementes, em especial, de florestais nativas. Observou-se na literatura ser um gênero com maior ocorrência em cereais. Farias et al. (2002), encontraram *Bipolaris* em sementes de aveia-preta (*Avena strigosa*) em maior incidência. Macedo et al. (2002) detectaram *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz. Todavia, Barreto et al. (2011), detectaram esse gênero em sementes das plantas ornamentais herbáceas, *Dahlia pinnata*, *Salvia splendens*, *Zinnia elegans* e *Viola tricolor*. Segundo Neergard (1979), *Bipolaris* possui efeito negativo na germinação de sementes e por consequência no estabelecimento das plântulas.

Os resultados obtidos mostraram que a flora fúngica associada aos diásporos de *G. polymorpha* é composta por vários gêneros, que podem de alguma forma interferir na germinação e na produção de mudas, refletindo na qualidade da muda produzida e acarretando prejuízos ao produtor. Nada se pode afirmar no que diz respeito aos danos que eles podem causar por não se conhecer resultados de pesquisa sobre taxas de transmissão e modelos epidemiológicos os quais possam quantificar os danos que os fungos associados às sementes causam à planta subsequente. Contudo, o conhecimento dos gêneros presentes permitirá a escolha do tratamento de sementes mais adequado, além de proporcionar perspectivas para outras pesquisas. Fazem-se necessários, além da realização do teste de sanidade, testes de patogenicidade e o acompanhamento do desempenho em viveiro para verificação dos possíveis danos causados tais fungos em *G. polymorpha*.

2.4 Conclusões

As temperaturas de 15° e 20°C são as mais adequadas para a germinação das sementes de *G. polymorpha*. As sementes germinam tanto na presença quanto na ausência de luz, podendo ser classificadas como fotoblásticas neutras.

As concentrações de hipoclorito de sódio testadas não interferem na germinação das sementes de *G. polymorpha*. As concentrações 0 e 4% de NaClO proporcionam as menores médias de diásporos com papus contaminados. Em diásporos sem papus, as menores médias de contaminação são nas concentrações 3, 4 e 0%.

Os gêneros fúngicos identificados nos diásporos de *G. polymorpha* são *Bipolaris*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Aspergillus* e *Epicoccum*.

CAPÍTULO III

***Trichoderma* spp. NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E NO CRESCIMENTO VEGETAL DE *Gochnatia polymorpha* (LESS.) CABRERA**

RESUMO

A produção e cultivo de mudas florestais nativas apresentam dificuldades, sendo a interação entre espécies florestais e trichoderma uma alternativa promissora, mas ainda pouco explorada cientificamente, que poderá promover a germinação das sementes e o crescimento do vegetal. Para isso é imprescindível conhecimento por pesquisas envolvendo espécies florestais nativas como *Gochnatia polymorpha* (cambará), espécie recomendada para recuperação de áreas degradadas, utilizada na medicina popular e a madeira usada para diversos fins. Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito de *Trichoderma* spp. na germinação *in vitro*, *ex vitro* e no crescimento vegetativo de *G. polymorpha*. Os testes *in vitro* foram realizados utilizando-se as técnicas do papel celofane e confrontação direta. Pela técnica do papel celofane foram avaliados os isolados TSM1 e TSM2 de *Trichoderma viride*, 2B2 e 2B22 de *Trichoderma harzianum*, mais dois produtos comerciais, Trichodermil[®] e Agrotrich[®], na contaminação dos diásporos e na germinação das sementes. A técnica de confrontação direta foi realizada utilizando-se os mesmos isolados no antagonismo a quatro fungos contaminantes dos gêneros *Bipolaris*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Phoma*, previamente isolados dos diásporos. Os experimentos *ex vitro* foram realizados em casa de vegetação com substrato autoclavado e não autoclavado, onde foram avaliados os efeitos dos quatro isolados de trichoderma, um mix preparado com a mistura destes quatro isolados, além dos dois produtos comerciais. A análise dos dados permite concluir que os quatro isolados de trichoderma testados mais os dois produtos comerciais são eficientes no controle *in vitro* da contaminação fúngica dos diásporos. Com a técnica do papel celofane utilizando-se meio de cultura ágar-água + BD não é possível avaliar o efeito de trichoderma na germinação *in vitro* das sementes. Na confrontação direta, o isolado 2B22 e o produto Agrotrich[®] são os mais eficientes no antagonismo a *Bipolaris* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* pp. e *Phoma* sp. Tanto em substrato autoclavado quanto em não autoclavado, os isolados de trichoderma testados não interferem na emergência das plântulas, mas os isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum* promovem o crescimento vegetativo de *G. polymorpha*.

Palavras-chave: Espécie florestal. Espécie nativa. Interação planta-microrganismo. Bioagente.

3.1 Introdução

Gochnatia polymorpha conhecida no Rio Grande do Sul por cambará, é uma espécie arbórea pertencente a família Asteraceae, nativa e com distribuição em vários estados brasileiros. A espécie proporciona madeira para obras imersas, construção civil e moirões. O tronco e as raízes produzem curvas para embarcações, carvão e lenha. Apresenta características ornamentais e medicinais, sendo as folhas e cascas utilizadas no preparo de chás para afecções bronco-pulmonares, as flores são melíferas (BACKES; IRGANG, 2002; LORENZI, 1998; STEFANELLO et al., 2006). É recomendada para arborização urbana, recuperação de ecossistemas degradados e conservação do solo, sendo indicada como planta fixadora de barrancas de rios e reposição de mata ciliar (CARVALHO, 1994; 2003; GLUFKE, 1999; JUNIOR et al., 2005; PIÑA-RODRIGUES et al., 2007).

O processo de ocupação do território brasileiro gerou grandes perdas do ponto de vista ambiental e essencialmente florestal. Nesse sentido, uma das formas de compensar a degradação gerada é a obtenção de mudas, a partir de sementes florestais nativas, para serem utilizadas em programas de reposição florestal, recuperação de áreas degradadas, arborização urbana, preservação de espécies nativas em risco de extinção, entre outras atividades que necessitam das mesmas (VIEIRA et al., 2001). No entanto, as sementes florestais de espécies nativas disponíveis em populações naturais não são suficientes para atender a demanda e muitas não apresentam boa qualidade (SILVA; HIGA, 2006).

Além da falta de qualidade genética e fisiológica decorrentes do pequeno número de árvores matrizes disponíveis em populações naturais que se encontram extremamente fragmentadas (SILVA; HIGA, 2006), sementes são estruturas atacadas por patógenos, o que afeta a qualidade e reduz a capacidade germinativa das mesmas (CARNEIRO, 1987). Ainda, dependendo da espécie, poderá haver uma demora para iniciar a produção de sementes (CALDAS, 2006).

Outro fator limitante na produção de mudas florestais nativas é a falta de conhecimento sobre a propagação das plantas, pois poucas são as espécies que têm sido estudadas e um número ainda menor tem sido objeto de implantação de testes por pesquisadores e viveiristas (LORZA et al., 2006). Tais dificuldades de produção e cultivo fazem com que as mudas florestais nativas sejam comercializadas com baixa qualidade e a altos custos, dificultando a utilização das mesmas para os diversos interesses. Por outro lado, algumas estratégias podem ser implantadas para amenizar esses problemas.

O desenvolvimento de técnicas silviculturais para estimular a germinação de sementes e o crescimento vegetal é carente para a maioria das espécies florestais nativas e que poderia beneficiar a planta de diversas formas, entre elas, encurtar o tempo até a frutificação (CALDAS, 2006). A interação entre plantas e microrganismos é uma alternativa sustentável que vem sendo pesquisada nas instituições de ensino e centros de pesquisa, segundo Altomare et al. (1999), espécies de trichoderma estão entre os fungos mais comumente estudados como agentes no controle biológico de fitopatógenos e na promoção da germinação de sementes e do crescimento vegetal.

Diferentes isolados de trichoderma têm levado a aumentos significativos na porcentagem e na precocidade de germinação (MELO, 1996), além do aumento no crescimento vegetal e na produtividade de culturas agrícolas inoculadas com este bioagente, como milho, feijão, arroz, ervilha, grão-de-bico, pepino, berinjela, pimentão, rabanete, tomate, alface, cenoura, cravo, crisântemo, algodão, entre outras (ALMANÇA, 2005; GRAVEL et al., 2007; HARMAN et al., 2004; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009; JYOTSNA et al., 2008; LUZ, 2001; RESENDE et al., 2004; YEDIDIA et al., 2001).

Desse modo, a contribuição de espécies de trichoderma no aumento da germinação de sementes e do crescimento vegetal é comprovada. Em vários estudos tem se observado que *Trichoderma harzianum*, introduzido no solo, tem reduzido a severidade de doenças nas plantas e induzido a estimulação da germinação e do crescimento vegetal de várias espécies, entretanto, existem poucos relatos de pesquisas envolvendo a interação de trichoderma e espécies florestais (DONOSO et al., 2008), sendo que os resultados desta interação poderá otimizar a produção de mudas e conseqüentemente reduzir o extrativismo de florestas naturais; contribuir nos programas de reflorestamentos no Brasil, acelerando processos de recuperação de áreas degradadas; além da conservação genética da espécie e de vantagens para produtores em viveiros. Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito de *Trichoderma* spp. na germinação *in vitro*, *ex vitro* e no crescimento vegetativo de *G. polymorpha*.

3.2 Material e métodos

Os ensaios experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Interação Planta-Microrganismos e em casa de vegetação climatizada, pertencentes ao Departamento de Biologia, do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria.

3.2.1 Material botânico

Foram coletados ramos com infrutescências de *G. polymorpha* em janeiro de 2011, em uma população natural, no Distrito Boca do Monte do município de Santa Maria – RS (29° 41' 43,311''S 53° 48' 41,041''O). As infrutescências secaram aproximadamente quatro dias a temperatura ambiente e, após foi realizada a extração manual dos diásporos (cipsela com papus), que foram armazenados sob refrigeração a $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até a implantação dos experimentos.

Uma exsicata foi incorporada ao herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número de registro SMDB – 13.139.

3.2.2 Obtenção dos isolados de trichoderma

Foram utilizados nos experimentos dois isolados de *Trichoderma viride*, TSM1 e TSM2, dois isolados de *Trichoderma harzianum*, 2B2 e 2B22, que estavam armazenados no Laboratório de Interação Planta-Microrganismo - CCNE/UFSM. Também foram utilizados dois produtos comerciais à base de trichoderma que foram adquiridos junto aos fabricantes. No experimento de promoção de germinação *ex vitro* das sementes e do crescimento também foi utilizado um mix, preparado com uma mistura dos isolados TSM1, TSM2, 2B2 e 2B22.

3.2.3 Trichoderma na germinação das sementes e na contaminação *in vitro* dos diásporos de *G. polymorpha*

Esse experimento foi realizado utilizando-se a técnica *in vitro* do papel celofane, modificada de Ethur (2002). Avaliou-se o efeito de isolados de trichoderma no percentual de germinação das sementes e de contaminação dos diásporos de *G. polymorpha*. Foram utilizados quatro isolados de trichoderma, sendo TSM1 e TSM2 de *T. viride*; 2B2 e 2B22 de *T. harzianum*, e dois produtos comerciais à base de trichoderma, Trichodermil[®] e Agrotrich[®], além dos tratamentos controle, sem isolados de trichoderma.

O meio de cultura utilizado foi uma mistura de meio de cultura ágar-água e meio de cultura BD, sendo 70% ágar-água e 30% BD (batata e dextrose – 200 g de batata, 20 g de dextrose, 1000 mL de água destilada). Utilizou-se ágar 0,7% e pH ajustado a $5,8 \pm 0,2$ em placas de Petri (9 cm de diâmetro). O meio de cultura foi coberto, assepticamente, com um disco de papel celofane semipermeável, esterilizado (120°C/40 minutos) e discos de 16 mm

de meio de cultura à base de aveia (40 g de aveia, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada) contendo micélios e esporos dos isolados de trichoderma foram transferidos para o centro das placas.

As placas dos tratamentos controle foram cobertas com o disco de papel celofane, mas não receberam o disco de micélio e esporos dos isolados. As placas foram vedadas com filme de PVC e as culturas mantidas em câmara climática do tipo Biosystem Organized Development (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas por cinco dias, estipulados previamente em um experimento onde se testou três e cinco dias de incubação com trichoderma.

Decorrido o período de incubação, em condições assépticas, as placas de Petri foram abertas e foi retirado o papel celofane juntamente com os discos de micélios e esporos, permanecendo no meio de cultura apenas os metabólitos não-voláteis liberados pelos isolados, onde foram semeados os diásporos (Figura 6), que previamente passaram por um processo de desinfestação, que consistiu na imersão por 15 minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) 2% acrescido de duas gotas de detergente líquido e três lavagens em água destilada e autoclavada.

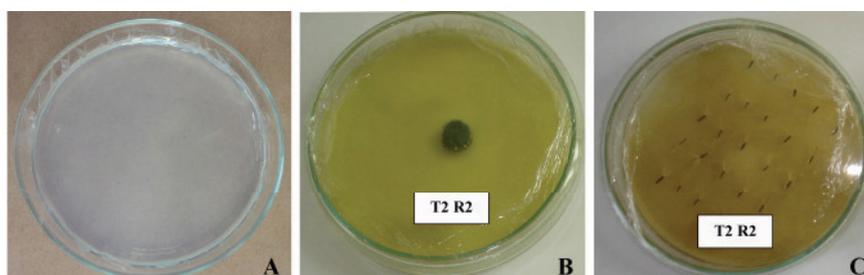


Figura 6 – (A) placa com meio de cultura coberto pelo papel celofane; (B) disco de micélio de trichoderma sobre o papel celofane com liberação de metabólitos não-voláteis; (C) diásporos de *Gochmatia polymorpha* após a retirada do papel celofane e dos discos de micélio

Além dos tratamentos com os isolados de trichoderma, foram avaliados quatro tratamentos controle, sendo que em dois deles utilizou-se meio de cultura ágar-água sem BD (Quadro 1). As culturas foram mantidas a 25°C com fotoperíodo de 16 h. As avaliações constaram da contagem dos diásporos contaminados por sete dias e da contagem das sementes germinadas por 25 dias, contados 24 horas após a instalação do experimento.

Foram avaliados dez tratamentos dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento; cada parcela experimental constituída por 25 diásporos, totalizando 200 por tratamento.

Tratamentos	Descrição dos tratamentos	Meio de cultura
T1	TSM1 + NaClO	Ágar-água + BD
T2	TSM2 + NaClO	Ágar-água + BD
T3	2B2 + NaClO	Ágar-água + BD
T4	2B22 + NaClO	Ágar-água + BD
T5	Trichodermil [®] + NaClO	Ágar-água + BD
T6	Agrotrich [®] + NaClO	Ágar-água + BD
T7	Controle 1 - NaClO	Ágar-água + BD
T8	Controle 2 - Sem isolados e sem NaClO	Ágar-água + BD
T9	Controle 3 - NaClO	Ágar-água
T10	Controle 4 - Sem isolados e sem NaClO	Ágar-água

Quadro 1 – Tratamentos constituintes do experimento realizado pela técnica *in vitro* do papel celofane onde foi avaliado o efeito de trichoderma na contaminação dos diásporos e na germinação das sementes de *Gochnatia polymorpha*

3.2.4 Antagonismo *in vitro* de trichoderma a fungos presentes nos diásporos de *G. polymorpha*

Com a técnica *in vitro* de confrontação direta foi observada a ação dos antagonistas sobre quatro fungos contaminantes em maior incidência, isolados previamente dos diásporos de *G. polymorpha*. Utilizaram-se quatro isolados de trichoderma, TSM1, TSM2, 2B2 e 2B22, e dois produtos comerciais, Trichodermil[®] e Agrotrich[®] combinados com os quatro fungos contaminantes, *Bipolaris* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Phoma* sp., mais quatro tratamentos testemunha, contendo somente os fungos contaminantes.

Um disco de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), de 16 mm, contendo micélio e esporos dos fungos contaminantes foi transferido para placas de Petri (9 cm de diâmetro), que continham meio de cultura BDA, a 1 cm da borda. O material foi incubado durante 48 horas, a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Decorrido esse período, um disco de BDA, de 16 mm de diâmetro, com estruturas dos antagonistas foi transferido para as placas em posição oposta ao disco de micélio do patógeno (Figura 7). As placas foram mantidas durante oito dias a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

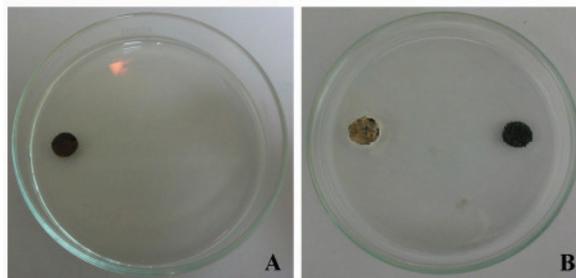


Figura 7 – (A) disco de micélio de *Alternaria* sp. em meio de cultura BDA; (B) a esquerda disco de micélio de *Phoma* sp. e a direita disco de *Trichoderma* sp.

A avaliação foi realizada no oitavo dia após a introdução do antagonista, baseada no critério de Bell et al. (1982), que adota uma escala de notas variando de 1 a 5. Critérios de avaliação: 1- antagonista cresce por toda a placa de Petri; 2- antagonista cresce e atinge uma parte do patógeno, cresce sobre 2/3 da placa; 3- antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa, nenhum organismo domina o outro; 4- patógeno cresce e atinge uma parte do antagonista, cresce sobre 2/3 da placa; 5- o patógeno cresce por toda a placa. Também foi realizada uma avaliação aos 11 dias após a introdução do antagonista, a fim de se observar aqueles isolados que não apresentaram bom desempenho (notas entre 1 e 1,5) em oito dias.

Foram avaliados 28 tratamentos dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento.

3.2.5 Trichoderma na germinação *ex vitro* das sementes (emergência das plântulas) e no crescimento vegetativo de *G. polymorpha*

Esse experimento foi desenvolvido em casa de vegetação climatizada com temperatura programada a 25°C, utilizando-se substrato esterilizado e substrato não esterilizado para fazer uma relação entre a ação dos isolados nos dois ambientes. Utilizaram-se quatro isolados de trichoderma, TSM1, TSM2, 2B2 e 2B22, um mix, preparado com a mistura dos quatro isolados e dois produtos comerciais, Trichodermil® e Agrotich®.

3.2.5.1 Substrato

Utilizou-se uma mistura de substrato da marca Tecnomax® e vermiculita expandida na proporção 2:1. O substrato esterilizado foi autoclavado a 120°C por uma hora, dois dias, com um intervalo de 24 horas. A aplicação de trichoderma nos substratos, esterilizado e não

esterilizado, foi realizada através de pós biológicos preparados com os isolados, com exceção dos pós comerciais que foram adquiridos.

3.2.5.2 Preparo do pó biológico à base de trichoderma

Discos de meio de cultura contendo micélio e esporos dos isolados foram transferidos, cada isolado separadamente, sobre 150 g de arroz umedecido com 25 mL de água destilada em sacos de polipropileno de 500 mL, previamente esterilizados em autoclave a 120°C por uma hora, dois dias seguidos com um intervalo de 24 horas. Os sacos contendo o arroz com os discos de micélio foram mantidos a temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas por 15 dias, para a colonização do arroz pelo fungo. Decorrido esse período, o arroz colonizado foi transferido para envelopes de papel e foi realizada a secagem desse material em estufa a temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$ por cinco dias. Depois de seco, o arroz foi triturado em liquidificador e peneirado, separando-se o pó fino (Figura 8). Para estimar a concentração de unidades formadoras de colônias por grama de pó biológico ($\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$) foi realizada contagem usando câmara de Neubauer e a técnica de diluição seriada (FERNANDEZ, 1993).

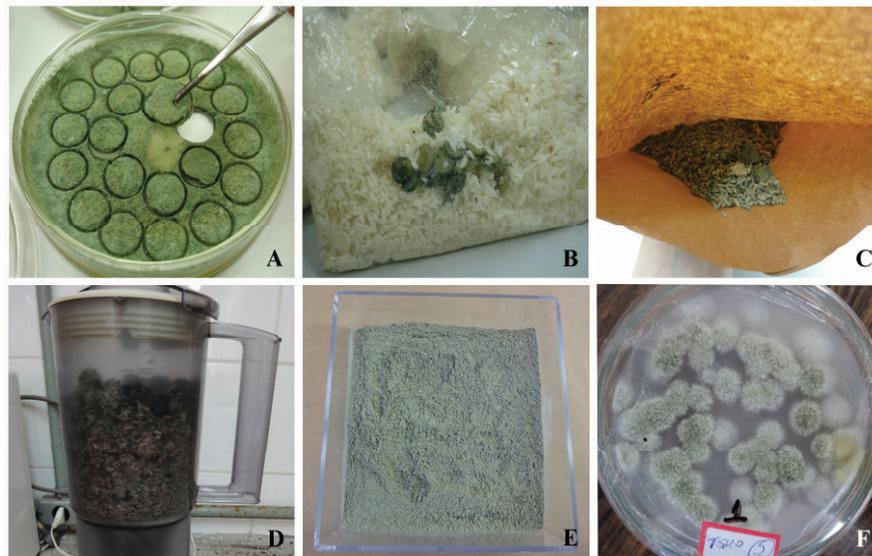


Figura 8 – Preparo do pó biológico à base de trichoderma: (A) discos de micélio e esporos em meio de aveia; (B) arroz autoclavado com os discos; (C) inóculo em envelope de papel seco na estufa; (D) inóculo a ser triturado no liquidificador; (E) inóculo de trichoderma na forma de pó biológico; (F) teste de viabilidade em diluições seriadas em meio BDA.

3.2.6 Implantação do experimento

Aplicaram-se os mesmos tratamentos em substrato esterilizado e não esterilizado (Quadro 2). A aplicação dos pós biológicos nos substratos foi realizada sete dias antes da semeadura para a colonização do trichoderma no substrato. Utilizou-se 2 g de pó biológico por Kg de substrato, conforme recomendação dos fabricantes dos produtos comerciais, sendo essa dose ajustada para que todos os tratamentos recebessem o equivalente a 10^6 UFC.g⁻¹ de pó biológico, com exceção do Trichodermil[®] que possui uma concentração de 10^8 UFC.g⁻¹. Os isolados TSM1, TSM2, 2B2, 2B22 e o mix também foram testados na concentração de 4 g de pó por Kg de substrato, além de dois tratamentos controle (sem trichoderma) (Quadro 2).

Tratamentos em substrato esterilizado	Tratamentos em substrato não esterilizado	Isolado de trichoderma	Dose de pó biológico
T1	T14	TSM1	Dose 1
T2	T15	TSM1	Dose 2
T3	T16	TSM2	Dose 1
T4	T17	TSM2	Dose 2
T5	T18	2B2	Dose 1
T6	T19	2B2	Dose 2
T7	T20	2B22	Dose 1
T8	T21	2B22	Dose 2
T9	T22	Mix	Dose 1
T10	T23	Mix	Dose 2
T11	T24	Trichodermil [®]	Dose 1
T12	T25	Agrotrich [®]	Dose 1
T13	T26	Sem isolado	Controle

Quadro 2 – Tratamentos constituintes do experimento *ex vitro* realizado em casa de vegetação onde foi avaliado o efeito de isolados de trichoderma na emergência das plântulas e no crescimento vegetativo de *Gochnatia polymorpha*

Para a instalação desse experimento utilizaram-se 156 recipientes plásticos, com capacidade para 500 mL, metade recebeu substrato esterilizado e a outra parte substrato não esterilizado. Os recipientes com substrato esterilizado foram mantidos separados dos com substrato não esterilizado para que não ocorresse contaminação (Figura 9).

Foram semeados 50 diásporos por parcela a uma profundidade de 0,5 cm. A irrigação foi realizada diariamente e constou de 20 a 80 mL de água destilada ao dia, variando de acordo com a necessidade.

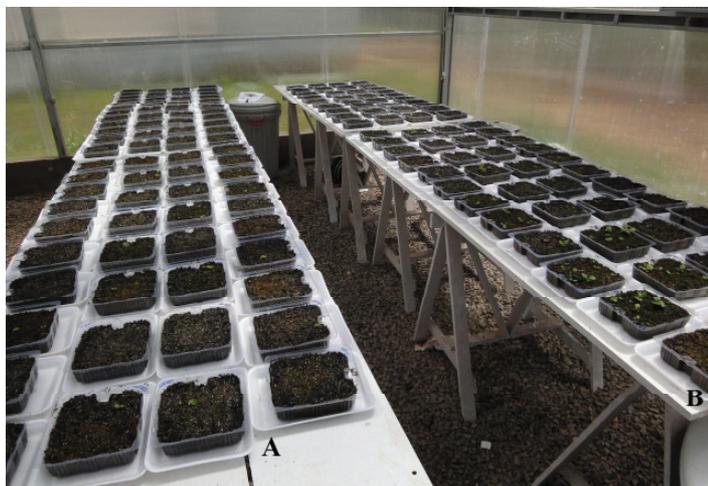


Figura 9 – Experimento na casa de vegetação: (A) substrato não autoclavado; (B) substrato autoclavado

Nesse experimento foram realizadas as seguintes avaliações das plântulas:

Primeira contagem de emergência: realizou-se aos 28 dias, os dados obtidos foram empregados para calcular-se a porcentagem da primeira contagem de emergência das plântulas (NAKAGAWA, 1994).

Porcentagem de emergência: foram contadas as plântulas emergidas a cada sete dias, por 12 semanas. Ao final das 12 semanas foi determinada a porcentagem total de emergência, através do número de plântulas emergidas em relação ao número de diásporos colocados para germinar (BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

Índice de velocidade de emergência (IVE): foi calculado o IVE, somando-se o número de plântulas emergidas a cada sete dias, divididas pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da semeadura, conforme Maguire (1962) (NAKAGAWA, 1994).

Porcentagem de plântulas sobreviventes: foi determinada ao final das 12 semanas, através do número de plântulas sobreviventes em relação ao número de plântulas emergidas.

Número de folhas: realizou-se a contagem do número de folhas por plântula e calculado a média aritmética (MUNIZ et al., 2007).

Altura: foi medida em cm do colo da plântula até o ápice caulinar e calculado a média aritmética (NAKAGAWA, 1994).

Comprimento da maior raiz: foi medido em cm e calculado a média aritmética (NAKAGAWA, 1994).

Peso da massa fresca da parte aérea e da raiz: as plântulas foram retiradas do substrato, lavadas em água corrente para retirar os resíduos de substrato retidos nas raízes e então, deixadas para escorrer em papel absorvente. Após, foi realizado um corte na base do caule, separando-se a parte aérea da raiz. Realizou-se, então, a pesagem, por repetição, em balança com precisão de 0,001 g, da parte aérea e da raiz, separadamente, e calculado a média aritmética por plântula (NAKAGAWA, 1994).

Peso da massa seca da parte aérea e da raiz: após ter-se obtido o peso da massa fresca da parte aérea e da raiz, o material foi colocado em sacos de papel e levado para estufa, mantido à temperatura de 60-65°C, onde permaneceu até atingir peso constante, quando foi pesado e determinado o peso médio da massa seca por plântula (NAKAGAWA, 1994).

Foram avaliados 26 tratamentos, sendo 13 em substrato esterilizado e 13 em substrato não esterilizado, dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento; cada parcela experimental constituída por 50 diásporos, totalizando 300 por tratamento.

3.2.7 Análise estatística

Para cada variável avaliada, realizou-se uma análise estatística para o substrato autoclavado e outra análise para o substrato não autoclavado. Quando necessário, os dados em porcentagem, foram transformados para o arcoseno da raiz quadrada, e os demais dados transformados pelo procedimento Box Cox, utilizando o programa estatístico Action 2.2. Após, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey à probabilidade de 5% de erro, pelo programa estatístico Assistat 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). Os dados que não atenderam as pressuposições de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis pelo programa Action 2.2.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Efeito de trichoderma na contaminação dos diásporos e na germinação *in vitro* das sementes de *G. polymorpha*

A técnica do papel celofane é utilizada na seleção de microrganismos antagonistas produtores de compostos antifúngicos, como substâncias antibióticas ou metabólitos (REIS et

al., 1995). A liberação de metabólitos não-voláteis e inibição no crescimento de fitopatógenos foram observadas por Silva (1997), que utilizou esse método e constatou que isolados de *T. viride* e *T. harzianum* foram efetivos quanto à inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, um fungo causador de doenças. Ethur et al. (2005), também utilizaram essa técnica, com o objetivo de selecionar agentes biocontroladores para esse mesmo patógeno.

O papel celofane, semi-permeável, permite a nutrição e crescimento do antagonista, além da difusão de metabólitos para o meio de cultura (ETHUR, 2002), onde são inseridos discos contendo estruturas do patógeno. Nesse experimento a técnica foi modificada, ao invés de se transferir para o meio de cultura discos do patógeno, transferiu-se os diásporos de *G. polymorpha*, a fim de se avaliar o efeito de metabólitos liberados por isolados de trichoderma no controle de fungos presentes e na promoção de germinação das sementes.

Verificou-se que houve a liberação de metabólitos não-voláteis pelos isolados, devido à coloração diferenciada observada no meio de cultura (Figura 10) e às diferenças obtidas nas médias de contaminações dos diásporos nos diferentes tratamentos (Tabela 9).

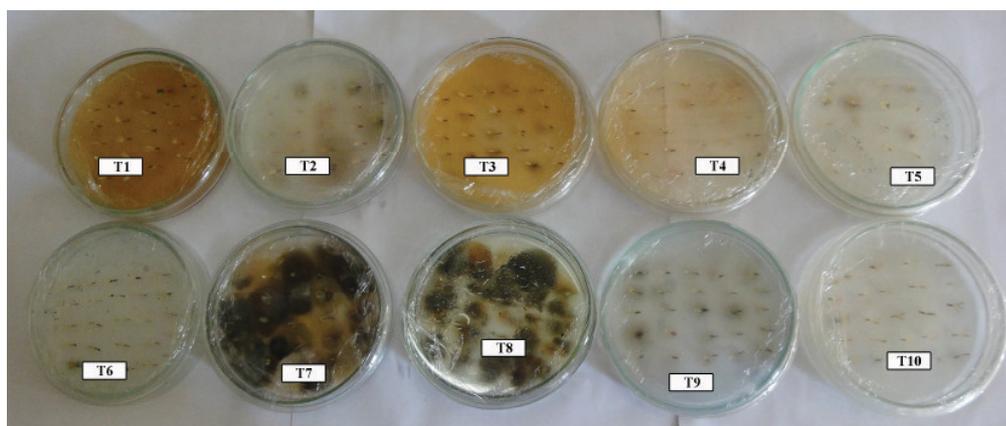


Figura 10 – Efeito de isolados de trichoderma na contaminação fúngica de diásporos de *Gochnatia polymorpha* pela técnica *in vitro* do papel celofane

Observa-se na Tabela 9 que todos os tratamentos com trichoderma (T1 ao T6) inibiram o crescimento de fungos contaminantes, reduzindo as médias de contaminação quando comparadas às médias dos controles 1 e 2 (T7 e T8). Embora os tratamentos com trichoderma não tenham diferido estatisticamente entre si, aqueles que apresentaram as menores médias de contaminação foram TSM1 e TSM2 de *T. viride* (2,5 e 4,5%, respectivamente), 2B22 de *T. harzianum* (9,5%) e o produto comercial Agrotich[®] (17%). Os tratamentos controle 1 e 2 obtiveram uma média de contaminação de 93,5 e 100%, respectivamente, demonstrando que na ausência dos antagonistas a contaminação foi alta.

Os controles 3 e 4 obtiveram uma média baixa de contaminação (36,50 e 6%, respectivamente). Nestes controles utilizou-se meio de cultura água-água sem a adição de BD e a inclusão desses, nesse experimento, visou observar o comportamento dos diásporos em relação à promoção da germinação das sementes, que será discutido adiante.

Tabela 9 – Efeito dos isolados de trichoderma pela técnica *in vitro* do papel celofane em meio de cultura ágar-água + BD na contaminação dos diásporos e na germinação das sementes de *Gochnatia polymorpha*. Santa Maria - RS (2011).

Tratamentos	Descrição dos tratamentos	Contaminação (%)	Germinação (%)
T1	TSM1 + NaClO	2,50 d*	0,50 bc
T2	TSM2 + NaClO	4,50 d	0,50 bc
T3	2B2 + NaClO	20,00 abcd	0 c
T4	2B22 + NaClO	9,50 cd	0,50 bc
T5	Trichodermil [®] + NaClO	33,50 abcd	0 c
T6	Agrotrich [®] + NaClO	17,00 cd	0 c
T7	Controle 1: NaClO	93,50 ab	0 c
T8	Controle 2: S/ isolado e s/ NaClO	100 a	0,50 bc
T9	Controle 3: NaClO**	36,50 abc	15,50 a
T10	Controle 4: S/ isolado e s/ NaClO**	6,00 cd	11,50 ab

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

**Controles em meio de cultura ágar-água sem adição de BD

A diferença observada nas médias de contaminação, entre os isolados, também foi observada por Ethur (2002), porém no estudo da autora, os índices variados entre os isolados foi em relação à inibição micelial do patógeno *S. sclerotiorum*. Hilgemberg et al. (2007), também observaram essa variação entre os antagonistas *Trichoderma* spp. e *Trichotecium roseum*, ao crescimento micelial de fungos de solo, *S. sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* sp. Essa variabilidade na ação dos antagonistas pode estar relacionada à produção dos metabólitos. Segundo Harman (2000), muitas espécies estudadas produzem metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. De acordo o autor, duas linhagens de *T. harzianum* (T39 e NCIM1185) produzem uma protease que é capaz de degradar enzimas sintetizadas pelo patógeno *Botrytis cinerea*, demonstrando especificidade entre alguns isolados e o patógeno.

Esse experimento também visou observar o efeito do trichoderma na promoção da germinação *in vitro* das sementes de *G. polymorpha*. Segundo Baugh e Escobar (2007), a ação de trichoderma como estimulador da germinação e do crescimento vegetal é complexa e realizada por interações com fatores bioquímicos e produção de diversas enzimas e compostos benéficos. Entretanto, no presente estudo, não foi possível avaliar o efeito dos isolados testados sobre a germinação, pois a adição de BD no meio de cultura possivelmente impediu a germinação das sementes, conforme observado nos resultados da Tabela 9, onde se verifica maior média de germinação apenas para os controles 3 e 4 (15,5 e 11,5%, respectivamente), em que se utilizou meio de cultura ágar-água sem a adição de BD.

3.3.2 Antagonismo *in vitro* de trichoderma a fungos presentes nos diásporos de *G. polymorpha*

No pareamento de culturas, avaliou-se a ação dos isolados antagonistas, após oito e 11 dias da incorporação destes. Os seis tratamentos com trichoderma demonstraram resultados variados no confronto *in vitro* com os patógenos testados (Tabela 10).

Tabela 10 – Médias das notas de antagonismo de isolados de trichoderma a quatro fungos contaminantes isolados dos diásporos de *Gochnatia polymorpha*, em pareamento de culturas. Santa Maria – RS (2011).

Tratamentos	Médias das notas							
	<i>Bipolaris</i> sp.		<i>Alternaria</i> sp.		<i>Cladosporium</i> sp.		<i>Phoma</i> sp.	
	8 dias	11 dias	8 dias	11 dias	8 dias	11 dias	8 dias	11 dias
TSM1	2	1,5	1	1	1	1	1	1
TSM2	2,5	1	1	1	1	1	1	1
2B2	2,25	1	1	1	1	1	2	1,75
2B22	1,5	1	1	1	1	1	1,5	1
Agrotrich [®]	1	1	1,25	1	1	1	1	1
Trichodermil [®]	3	3	2	1,5	1,75	1,75	2,25	2
Testemunha	4	5	2,5	2,75	2	2	5	5

Aos oito dias do teste, o isolado 2B22 e o produto Agrotrich[®] apresentaram ótimo desempenho no confronto aos quatro patógenos testados, obtendo notas entre 1 e 1,5 (Figura 11). Os isolados TSM1 e TSM2 também apresentaram ótimo desempenho no confronto com

Alternaria sp., *Cladosporium* sp. e *Phoma* sp., com nota 1 em todos os tratamentos, mas não com *Bipolaris* sp., que obtiveram notas de 2 e 2,5, respectivamente. O isolado 2B2, aos oito dias, só obteve bom desempenho no confronto com *Alternaria* sp. e *Cladosporium* sp., com notas 1 para cada fungo contaminante.

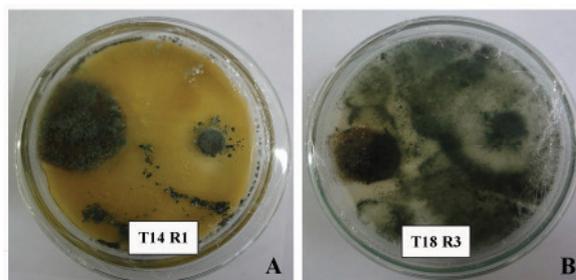


Figura 11 – (A) confronto entre o isolado 2B22 de *Trichoderma harzianum* e *Alternaria* sp. aos oito dias; (B) confronto entre *Agrotich*[®] e *Alternaria* sp. aos oito dias

Na segunda avaliação, realizada após 11 dias da incorporação do antagonista, observou-se que os isolados TSM1, TSM2 e 2B2 melhoraram seus desempenhos no confronto com *Bipolaris* sp., obtendo notas de 1,5; 1 e 1, respectivamente. O isolado 2B2, mesmo aos 11 dias, não foi tão eficiente no confronto com *Phoma* sp., obtendo uma nota média de 1,75. O produto comercial *Trichodermil*[®] obteve bom desempenho (nota 1,5) aos 11 dias do teste no confronto com *Alternaria* sp.

Os isolados de trichoderma demonstraram que possuem outras habilidades como agentes de biocontrole além da antibiose comprovada no teste do papel celofane. A antibiose é definida como a interação na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (STADNIK; BETTIOL, 2000), no entanto, segundo Bettiol (1991), uma característica recomendável, é que o antagonista aja através de mais de um mecanismo, combinando antibiose, parasitismo, competição e estímulo à defesa do hospedeiro.

No presente estudo, possivelmente ocorreu antibiose, hiperparasitismo e competição. De acordo com Melo (1998), no ponto de encontro entre os dois micélios possivelmente ocorre antibiose e parasitismo, uma vez que trichoderma pode detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção. Além disso, segundo Howell (2003), espécies de trichoderma são hábeis na supressão do crescimento de vários fungos em meios de cultura contendo ágar, como observado no tratamento de segmentos de raízes de feijoeiro infectadas com *Macrophomina phaseolina* e com *T. virens*, onde se observou que quando os segmentos foram plaqueados em meio com ágar, apenas *T. virens* cresceu a partir das raízes.

Os organismos competem entre si para obter nutrientes, água, luz, espaço, fatores de crescimento, oxigênio, entre outros, sendo a competição um dos clássicos mecanismos de biocontrole (MELO, 1996). Assim, o potencial hiperparasítico de trichoderma está relacionado com a competição por espaço e com atividades metabólicas que lhes permitem serem eficientes no hiperparasitismo das estruturas de outros fungos (HARMAN, 2000). Contudo, os mecanismos de ação são características de cepas específicas, o que possivelmente explica as diferenças observadas no desempenho dos isolados.

3.3.3 Efeito de trichoderma na emergência das plântulas e no crescimento vegetativo de *G. polymorpha*

Os efeitos do trichoderma sobre as avaliações de primeira contagem, porcentagem e índice de velocidade de emergência, bem como sobrevivência de plântulas, número de folhas, altura, comprimento da maior raiz, massa fresca e seca da parte aérea e da raiz de *G. polymorpha*, em substrato autoclavado, estão apresentados na Tabela 11.

Os resultados demonstraram que o efeito do trichoderma foi diversificado nas diferentes variáveis analisadas, o que vai ao encontro de Melo (1998), que diz que o sucesso do controle de fitopatógenos e da promoção de crescimento vegetal por bioagentes depende das propriedades e mecanismos de ação do organismo. Tal fato já foi observado para esses isolados nos testes realizados *in vitro*.

Em relação à porcentagem total de emergência de plântulas ao final de 12 semanas, a análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos com trichoderma e o controle. Resultados opostos foram encontrados por Kleifeld e Chet (1992), que observaram a ação positiva de isolado de *T. harzianum* em tratamento de semente e de solo na emergência de feijão, rabanete, tomate e pepino. Em experimentos de campo, a microbiolização com *T. harzianum* isolado T-22 proporcionou aumento significativo na emergência de plântulas de milho (LUZ, 2001).

Diniz et al. (2006), concluíram que a inoculação de sementes de alface com *T. viride* promoveu aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência das plântulas, mas no teste de germinação das sementes em laboratório, o mesmo isolado não diferiu do tratamento testemunha. Já Ousley et al. (1993), observaram que alguns isolados auxiliaram e outros inibiram a germinação de sementes de alface, demonstrando que o mecanismo de promoção de germinação é específico e alguns isolados podem, ainda, inibir a germinação, o que não foi observado no presente estudo.

Tabela 11 – Primeira contagem de emergência (PC), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), sobrevivência de plântulas, número de folhas, altura, comprimento da maior raiz, massa fresca (MF) da parte aérea (PA) e da raiz e massa seca (MS) da parte aérea e da raiz de *Gochnatia polymorpha* por isolados de trichoderma em substrato autoclavado. Santa Maria - RS (2011).

Tratamentos	PC (%)	E (%)	IVE	Sobrevivência (%)**	Número de folhas	Altura (cm)	Comp. raiz (cm)	MF PA (g)	MF Raiz (g)	MS PA (g)	MS Raiz (g)
TSM1 (1)	5,67 bc*	16,00 a	0,210 bc	90,03 ab	3,64 bcd	1,05 cd	10,19 d	0,082 def	0,091 efg	0,022 ef	0,019 efg
TSM1(2)	10,33 abc	25,67 a	0,338 abc	88,49 ab	3,82 bcd	1,06 cd	11,86 abcd	0,102 cde	0,111 cdef	0,027 cdef	0,023 cdef
TSM2 (1)	3,67 c	17,00 a	0,193 bc	96,43 ab	3,22 cd	0,81 de	9,82 d	0,046 def	0,048 fg	0,012 efg	0,010 fg
TSM2 (2)	7,67 abc	22,33 a	0,276 abc	89,15 ab	3,80 bcd	0,96 cde	10,79 cd	0,073 def	0,090 defg	0,018 def	0,018 defg
2B2 (1)	16,67 a	28,67 a	0,475 a	92,26 ab	4,71 abc	1,55 bc	16,47 abc	0,281 c	0,319 abcd	0,073 cd	0,055 bcd
2B2 (2)	14,67 ab	22,00 a	0,370 abc	90,00 ab	6,75 a	2,69 ab	18,26 a	0,916 ab	0,875 a	0,249 ab	0,138 ab
2B22 (1)	9,00 abc	20,57 a	0,282 abc	100 a	5,00 ab	1,50 abc	13,92 abcd	0,273 bc	0,314 abc	0,072 bc	0,056 abc
2B22 (2)	16,00 ab	25,67 a	0,414 ab	100 a	7,36 a	3,60 a	16,98 ab	1,113 a	0,895 ab	0,317 a	0,154 a
MIX (1)	11,67 abc	26,33 a	0,341 abc	63,98 b	2,60 d	0,68 e	9,57 d	0,022 f	0,030 g	0,004 g	0,006 g
MIX (2)	3,67 c	13,67 a	0,154 c	74,48 ab	2,80 d	0,78 de	8,74 d	0,037 ef	0,043 fg	0,009 fg	0,008 fg
Tricho (1)	3,67 c	16,67 a	0,177 c	70,67 ab	2,90 d	0,77 de	10,02 d	0,061 def	0,060 efg	0,015 efg	0,012 efg
Agro (1)	6,67 abc	21,00 a	0,243 bc	81,35 ab	3,46 bcd	1,03 cd	11,62 bcd	0,137 cd	0,192 bcde	0,034 cde	0,032 cde
Controle	3,00 c	16,33 a	0,166 c	90,86 ab	2,67 d	0,80 de	10,70 bcd	0,065 def	0,079 efg	0,014 efg	0,013 efg
CV%	37,14	39,32	40,19	-	11,78	12,26	15,98	21,67	19,80	22,33	22,41

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Nos tratamentos com (1) e (2) lê-se dose 1 e dose 2. Dose 1 = 2g/Kg de substrato (10^6 UFC.g⁻¹ de pó biológico); dose 2 = 4g/Kg de substrato (10^6 UFC.g⁻¹ de pó biológico).

Nos tratamentos denominados Tricho e Agro lê-se produto comercial Trichodermil[®] e produto comercial Agrotich[®].

Por outro lado, na análise de primeira contagem de emergência aos 28 dias, verificou-se a influência positiva de *T. harzianum*, isolados 2B2 (doses 1 e 2) e 2B22 (dose 2). Estes isolados também aceleraram a velocidade de emergência, que pode ser observada por meio do IVE, diferindo significativamente do controle. Esses resultados demonstraram que, embora na porcentagem total de emergência não tenha ocorrido diferença significativa, os referidos tratamentos permitiram um maior número de plântulas emergidas em um menor número de dias, possivelmente por permitir que essas não fossem atacadas por patógenos habitantes da espermosfera que poderiam afetar a emergência e o estabelecimento das plântulas. De acordo com Melo (1996), a aplicação de trichoderma não proporciona aumentos significativos somente na porcentagem, mas também na precocidade e velocidade de germinação.

Os resultados obtidos correspondem aos encontrados por Oliveira (2007) para sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius* - Asteraceae), em que o isolado TC 1.15 de *Trichoderma* sp. permitiu uma maior média de plântulas emergidas, mas não diferiu dos outros tratamentos, no entanto, o referido isolado proporcionou o maior IVE, com diferença significativa. Também estão de acordo com resultados obtidos por Ozbay et al. (2004) nos quais os isolados T22 e T95 de *T. harzianum* não auxiliaram na emergência do tamateiro, mas aumentaram o crescimento de plântulas.

Segundo Lucon (2009), a influência do trichoderma na germinação de sementes foi inicialmente relacionada ao controle de microrganismos prejudiciais presentes no solo. No presente estudo, o controle biológico pode ter contribuído nos resultados, mas nesse caso, dos patógenos presentes nos diásporos de *G. polymorpha*, já que o substrato foi autoclavado. Conforme a referida autora, na ausência de fitopatógenos de solo, a promoção de crescimento por trichoderma tem sido relacionada à produção de hormônios ou fatores de crescimento e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta.

Nesse estudo, a promoção do crescimento vegetativo de *G. polymorpha* por trichoderma pôde ser verificada pelas análises do número de folhas, altura de plântula, comprimento da maior raiz, massa fresca e seca da parte aérea e da raiz, onde foram observados efeitos significativos dos isolados comparando aos controles. Segundo Melo (1996) e Contreras-Cornejo et al. (2009), a aplicação de trichoderma tem proporcionado além de aumentos significativos na porcentagem e na precocidade de germinação, aumento no peso seco e na altura de plantas, além de estimular o desenvolvimento das raízes laterais.

Em relação à sobrevivência das plântulas, os isolados de trichoderma testados não aumentaram as médias de sobrevivência. A significância observada nessa análise foi para o tratamento constituído pelo mix (dose 1), preparado com a mistura dos isolados, o qual

reduziu a média de sobrevivência para 63,98% comparando com os dois tratamentos que obtiveram 100% de sobrevivência, constituídos pelo isolado 2B22 (doses 1 e 2), que não diferiram dos demais tratamentos. No entanto, Fortes et al. (2007), observaram que o tratamento com os isolados ST, E15 e S2 de *Trichoderma* sp. aumentou a sobrevivência de microestacas de eucalipto (*Eucalyptus* sp.).

De acordo com Agrios (2005), microrganismos agentes de controle biológico ou antagonistas podem agir de modo a aumentar a resistência da planta na presença de patógenos. Sabe-se que havia a presença de possíveis patógenos nos diásporos, mas a observação feita pelo referido autor, não foi observada nesse estudo, e ainda, o mix teve um efeito negativo. Ethur (2006) também observou que o tratamento constituído pelo mix de *T. harzianum* inibiu a germinação e o desenvolvimento de hipocótilo e radícula de pepineiro.

Quanto ao número de folhas por plântula, os tratamentos constituídos pelos isolados 2B2 (doses 1 e 2) e 2B22 (doses 1 e 2) foram os que apresentaram as maiores médias, não diferindo entre si. Os demais isolados testados não diferiram do controle, embora as médias tenham sido superiores ao controle em todos eles. Inbar et al. (1994) estudando o efeito de trichoderma no crescimento de pepineiro, observaram um aumento de 96% de área foliar em plântulas cultivadas em substrato tratado com o isolado T-203 de *T. harzianum*.

Em relação à altura medida em cm do colo ao ápice da plântula, os tratamentos constituídos pelos isolados 2B2 (doses 1 e 2) e 2B22 (doses 1 e 2), diferiram estatisticamente do controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Filho et al. (2008), que observaram diferença significativa na altura de mudas de um clone híbrido de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) e também em mudas *E. camadulensis* por isolados de *Trichoderma* sp. Donoso et al. (2008) observaram que *T. harzianum* promoveu a maior média de altura em plântulas de *Pinus radiata*.

Observou-se que *G. polymorpha* apresentou um bom crescimento do sistema radicular, sendo que o tratamento que apresentou a maior média quanto ao comprimento da maior raiz foi o 2B2 (dose 2) com média de 18,26 cm. Este tratamento não diferiu do TSM1 (dose 2), do 2B2 (dose 1) e do 2B22 (doses 1 e 2) com médias de 11,86; 16,47; 13,92 e 16,98 cm, respectivamente, entretanto, esses quatro tratamentos também não diferiram do controle (10,70 cm). Resultados semelhantes correspondem aos encontrados por Harman (2000), que obteve maior crescimento de raízes de soja e de milho tratadas com *T. harzianum* T-22 quando comparados com testemunhas não tratadas. Fortes et al. (2007) também observaram que o isolado E15 promoveu o enraizamento de microestacas de eucalipto (*Eucalyptus* sp.),

apresentando aumento significativo na porcentagem de enraizamento (62,25%) em relação ao tratamento testemunha (28,77%).

As análises das massas frescas e secas da parte aérea e da raiz demonstraram que os tratamentos constituídos pelos isolados 2B2 (doses 1 e 2) e 2B22 (doses 1 e 2) diferiram estatisticamente dos respectivos controles. Quanto à massa fresca da parte aérea, as médias dos referidos tratamentos foram respectivamente: 0,281; 0,916; 0,273 e 1,113 g, enquanto o controle obteve uma média de 0,065 g. Quanto à massa fresca da raiz, as médias dos referidos tratamentos foram: 0,319; 0,875; 0,314 e 0,895 g, enquanto o controle obteve uma média de 0,079 g. As médias quanto à massa seca da parte aérea foram: 0,073; 0,249; 0,072; 0,317 e o controle 0,014 g. Já as médias da massa seca da raiz foram: 0,055; 0,138; 0,056; 0,154 e o controle 0,013 g.

Embora os quatro referidos tratamentos com trichoderma tenham diferido estatisticamente dos respectivos controles, observou-se quanto à massa fresca e seca da parte aérea que, aqueles que obtiveram as maiores médias foram o 2B2 e o 2B22 nas doses 2. Quanto à massa seca da raiz, tal fato também foi observado, sendo que as maiores médias foram dos tratamentos com os isolados 2B2 (dose 2) e 2B22 (doses 1 e 2).

Tavares (2009) também obteve diferença significativa na biomassa fresca e seca total (parte aérea + raízes) de plantas de mamoeiro plantadas em solo contendo *T. harzianum* isolado T70 e *T. virens* isolado T68, quando comparados com o controle. Resende et al. (2004) observaram que *T. harzianum* estimulou maior acúmulo de matéria seca em plântulas de milho. Filho et al. (2008) avaliando a promoção de crescimento de mudas de um clone híbrido de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) observaram que o isolado CEN 162 de *T. asperellum* e o isolado CEN 262 de *T. harzianum* apresentaram as maiores médias de massa seca da raiz e da parte aérea, diferindo estatisticamente do controle.

Diante dos resultados obtidos para as variáveis analisadas, pôde-se inferir que os isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum* apresentaram-se potenciais como promotores do crescimento vegetal. Contudo, segundo Pomella e Ribeiro (2009), os mecanismos do trichoderma na promoção de crescimento vegetal, em ausência de fitopatógenos, são pouco esclarecidos em comparação aos mecanismos de ação envolvendo o controle biológico.

De acordo com Melo (1998), no controle de fitopatógenos, trichoderma apresenta-se capaz de inibir patógenos através de competição, parasitismo direto e antibiose, pela produção de metabólitos secundários, além de micoparasitismo de estruturas de resistência de patógenos, como escleródios, esporos e clamidósporos, em geral difíceis de serem destruídos, e ainda, é capaz de atuar como indutor de resistência das plantas contra doenças. Já a

propriedade de promoção do crescimento vegetal pode estar relacionada com o controle de patógenos, mas também envolve a produção de hormônios pelas plantas, disponibilização de nutrientes do solo ou matéria orgânica e aumento na captação ou translocação de minerais (KLEIFELD; CHET, 1992). Lucon (2009) acrescenta, ainda, a produção de hormônios ou fatores de crescimento pelos isolados.

Filho et al. (2008), observaram produção de ácido indolacético (AIA) em alguns isolados de *Trichoderma* spp., sendo que a produção desse hormônio foi detectada em baixos níveis nos isolados CEN 209 e CEN 500, e níveis consideravelmente superiores no isolado CEN 262. Hoyos-Carvajal et al. (2009), avaliaram a produção de metabólitos de 101 isolados de *Trichoderma* spp., 60% das cepas produziram ácido indolacético (AIA) ou análogos a auxina, 20% foram capazes de produzir formas solúveis de fosfato de rocha fosfática e 8% das amostras avaliadas mostraram capacidade de produzir sideróforos consistentes para converter ferro a formas solúveis.

Sob essa perspectiva, de acordo com Altomare et al. (1999), no solo, macro e micro nutrientes sofrem um equilíbrio dinâmico complexo de solubilização e insolubilização, fortemente influenciado pelo pH e pela microflora, que afeta a acessibilidade desses para serem absorvidos pelas raízes das plantas. Conforme os autores, a promoção de crescimento em plantas promovida pelo fungo *T. harzianum* T-22 está na sua habilidade de solubilizar muitos nutrientes importantes para a planta. Assim, os mecanismos de ação dos microrganismos são específicos e podem variar conforme a cultura e o ambiente, como a interferência de outros microrganismos, substrato, temperatura e umidade.

Nesse sentido, os mesmos tratamentos avaliados no substrato autoclavado também foram avaliados em substrato não autoclavado, a fim de se fazer uma análise entre a ação dos isolados de trichoderma nos dois ambientes, tal procedimento foi realizado por Ethur (2002). Os resultados obtidos dos efeitos de trichoderma na promoção de germinação das sementes e crescimento vegetal de *G. polymorpha*, em substrato não autoclavado, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Primeira contagem de emergência (PC), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), sobrevivência de plântulas, número de folhas, altura, comprimento da maior raiz, massa fresca (MF) de parte aérea (PA) e de raiz e massa seca (MS) de parte aérea e de raiz de *Gochmatia polymorpha* por isolados de trichoderma em substrato não autoclavado. Santa Maria - RS (2011).

Tratamentos	PC (%)**	E (%)	IVE	Sobrevivência (%)**	Número de folhas	Altura (cm)	Comp. raiz (cm)	MF PA (g)**	MF Raiz (g)**	MS PA (g)**	MS Raiz (g)**
TSM1 (1)	2,00 ab*	10,67 a	0,108 ab	80,06 a	2,40 c	0,63 c	7,79 b	0,023 bc	0,029 bc	0,006 bc	0,007 abc
TSM1 (2)	1,00 ab	11,00 a	0,094 ab	82,22 a	2,69 c	0,62 c	6,61 b	0,017 c	0,018 c	0,004 bc	0,004 c
TSM2 (1)	2,00 ab	19,00 a	0,164 ab	85,59 a	2,77 c	0,74 c	9,27 ab	0,035 abc	0,042 abc	0,007 abc	0,007 abc
TSM2 (2)	1,33 ab	8,00 a	0,084 b	85,12 a	2,68 c	0,75 c	8,52 b	0,026 bc	0,030 bc	0,006 bc	0,006 bc
2B2 (1)	4,00 ab	13,67 a	0,157 ab	80,70 a	3,58 bc	0,86 bc	11,74 ab	0,063 abc	0,095 abc	0,015 abc	0,018 abc
2B2 (2)	4,67 ab	18,00 a	0,206 ab	96,58 a	4,76 ab	1,34 ab	13,22 ab	0,250 ab	0,295 ab	0,059 ab	0,046 ab
2B22 (1)	3,00 ab	15,67 a	0,165 ab	86,04 a	3,33 bc	0,83 bc	13,04 ab	0,068 abc	0,105 abc	0,015 abc	0,018 abc
2B22 (2)	7,33 a	17,67 a	0,244 a	91,81 a	5,94 a	1,94 a	18,19 a	0,574 a	0,650 a	0,152 a	0,108 a
MIX (1)	4,33 ab	17,67 a	0,195 ab	55,59 a	2,56 c	0,67 c	8,26 b	0,019 bc	0,022 bc	0,004 c	0,004 bc
MIX (2)	0,33 b	9,00 a	0,071 b	61,67 a	2,79 c	0,75 c	8,66 ab	0,027 abc	0,028 abc	0,005 abc	0,005 bc
Tricho (1)	3,33 ab	13,33 a	0,138 ab	91,90 a	2,72 c	0,68 c	8,55 b	0,029 abc	0,037 abc	0,007 bc	0,008 bc
Agro (1)	2,33 ab	11,67 a	0,114 ab	74,63 a	2,49 c	0,72 c	8,86 b	0,030 abc	0,040 abc	0,006 abc	0,008 abc
Controle	2,67 ab	13,67 a	0,137 ab	67,15 a	2,60 c	0,73 c	9,52 b	0,022 bc	0,027 bc	0,005 abc	0,006 abc
CV%	-	25,69	27,61	-	22,32	18,51	17,34	-	-	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

** Foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Nos tratamentos com (1) e (2) lê-se dose 1 e dose 2. Dose 1 = 2g/Kg de substrato (10^6 UFC.g⁻¹ de pó biológico); dose 2 = 4g/Kg de substrato (10^6 UFC.g⁻¹ de pó biológico).

Nos tratamentos denominados Tricho e Agro lê-se produto comercial Trichodermil[®] e produto comercial Agrotrich[®].

Em relação à porcentagem de emergência no final das 12 semanas, verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos com os isolados de trichoderma e o controle. Esse mesmo resultado já havia sido obtido na análise dessa variável em substrato autoclavado. Já na análise da primeira contagem de emergência, realizada aos 28 dias, verificou-se que a média do tratamento constituído pelo mix (dose 2) foi inferior (0,33%) ao controle (2,67%), diferindo estatisticamente, entretanto, não pode-se dizer que esse tratamento inibiu a germinação, já que na contagem final não diferiu dos demais.

Quanto à velocidade de emergência, expressa por meio do IVE, foi possível observar que o isolado 2B22 (dose 2) obteve a maior média (0,244). Nessa análise também foi possível observar que os tratamentos TSM2 (dose 2) (0,084) e o mix (dose 2) (0,071) obtiveram médias inferiores ao controle (0,137), mas não diferindo deste. O resultado obtido para o mix pode ser devido à interação entre os isolados, já que individualmente o isolado 2B22 obteve a maior média. Em substrato autoclavado, resultado semelhante já havia sido observado, quando o tratamento constituído pelo mix (dose 2) obteve a menor média de IVE.

A análise de sobrevivência de plântulas ao final das 12 semanas mostrou que não houve diferença significativa entre os isolados e o controle, tendo este obtido uma média de 67,15% de sobrevivência, enquanto a maior média foi do 2B2 (dose 2), 96,58%. O tratamento que obteve a menor média (55,59) foi do mix (dose 1). Resultado semelhante também foi observado em substrato autoclavado, em que a média de sobrevivência de plântulas do mix (dose 1) foi a menor (63,98%). Segundo Melo (1991), um dos problemas de se introduzir antagonistas é que o hiperparasitismo pode ocorrer até mesmo entre espécies diferentes de trichoderma, sendo que esse fato sugere que a introdução de um dado isolado no solo pode, ainda, sofrer interferência de outras espécies indígenas.

As análises do número de folhas e da altura medida do colo ao ápice, por plântula, mostraram que os tratamentos constituídos pelos isolados 2B2 e 2B22 (doses 2), foram os que obtiveram as maiores médias, diferindo estatisticamente dos respectivos controles. O tratamento 2B2 obteve médias de 4,76 folhas por plântula e 1,34 cm de altura e o 2B22 obteve 5,94 folhas por plântula e 1,94 cm de altura, enquanto o controle obteve 2,60 folhas por plântulas e 0,73 cm de altura. A promoção de crescimento pelo isolado 2B22 também pôde ser observada pela análise do comprimento da maior raiz. O tratamento que atingiu a maior média foi o 2B22 (dose 2) com 18,19 cm, diferindo do controle com 9,52 cm. Os isolados 2B2 e 2B22 já haviam demonstrado os seus potenciais nessas mesmas variáveis analisadas em substrato autoclavado.

O isolado 2B22 (dose 2) também apresentou efeito positivo nas análises das massas frescas da parte aérea e da raiz. A maior média da massa fresca da parte aérea (0,574 g) diferiu estatisticamente do controle (0,022 g), fato que também ocorreu com a média da massa fresca da raiz (0,650 g), enquanto o controle obteve uma média de 0,027 g. Em substrato autoclavado, os isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum* (doses 1 e 2) também foram os que apresentaram os melhores resultados na análise dessas variáveis.

Em relação à massa seca, tanto da parte aérea quanto da raiz, embora as maiores médias tenham sido do 2B22 (dose 2) não foi observado diferença significativa entre os tratamentos e o controle. Resultados opostos foram encontrados para essas variáveis no substrato autoclavado. Dentre os fatores que podem ter contribuído para este resultado estão as ações dos isolados. Segundo Ethur (2006), o comportamento de fungos de solo, como trichoderma, pode modificar quando colocado em outro ambiente. Kleifeld e Chet (1992) obtiveram bons resultados na promoção de crescimento do pepineiro por isolado de *T. harzianum* tanto em solo autoclavado quanto em não autoclavado, entretanto, segundo os autores, a habilidade de *T. harzianum* em promover o crescimento de plantas varia com o tipo de substrato, como nutrientes ou matérias orgânicas disponíveis, e com a habilidade de competir com patógenos na rizosfera.

Nesse sentido, conforme Ethur (2002), o substrato autoclavado pode ter apresentado diferenças químicas quando comparado ao substrato não autoclavado e essas diferenças podem ter interferido nas variações encontradas no crescimento. O processo de autoclavagem pode ter acelerado a decomposição da matéria orgânica, causando, segundo Ghini e Bettiol (1995), modificações na solubilidade ou disponibilidade dos nutrientes.

Contudo, mesmo em substrato não autoclavado, percebeu-se pelas análises do número de folhas, altura, comprimento da maior raiz e massa fresca tanto da parte aérea quanto da raiz que os isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum*, na dose 2, apresentaram resultados positivos quanto ao crescimento vegetativo de *G. polymorpha*, confirmando aqueles obtidos por estes isolados, nas doses 1 e 2, em substrato autoclavado (Figuras 12 e 13).



Figura 12 – Diferenças no crescimento vegetal de *Gochnatia polymorpha* entre os isolados de trichoderma e o tratamento controle em substrato autoclavado. T1: TSM1 dose 1; T2: TSM1 dose 2; T3: TSM2 dose 1; T4: TSM2 dose 2; T5: 2B2 dose 1; T6: 2B2 dose 2; T7: 2B22 dose 1; T8: 2B22 dose 2; T9: mix dose 1; T10: mix dose 2; T11: Trichodermil[®] dose 1; T12: Agrotich[®] dose 1; T13: controle (sem trichoderma)



Figura 13 – Diferenças no crescimento vegetal de *Gochnatia polymorpha* entre os isolados de trichoderma e o tratamento controle em substrato não autoclavado. T14: TSM1 dose 1; T15: TSM1 dose 2; T16: TSM2 dose 1; T17: TSM2 dose 2; T18: 2B2 dose 1; T19: 2B2 dose 2; T20: 2B22 dose 1; T21: 2B22 dose 2; T22: mix dose 1; T23: mix dose 2; T24: Trichodermil[®] dose 1; T25: Agrotich[®] dose 1; T26: controle (sem trichoderma)

Esses resultados são de extrema relevância na implantação de técnicas silviculturais para promover o crescimento vegetal de *G. polymorpha* dada a sua importância econômica e principalmente ambiental, além disso, deixam perspectivas para aplicação em outras pesquisas com outras espécies florestais nativas. Segundo Caldas (2006), a interação entre microrganismos e espécies florestais é uma área carente e que pode encurtar o tempo até a frutificação, antecipando, desta forma, a obtenção de sementes e mudas para os mais diversos interesses.

Outro aspecto relevante dessa pesquisa, em relação aos isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum*, que se apresentaram potenciais na promoção do crescimento vegetal da espécie em estudo, é a possibilidade do desenvolvimento de trabalhos de pesquisas direcionados às diversas etapas para a obtenção de produtos biológicos à base de trichoderma, podendo futuramente originar um produto biológico comercial.

3.4 Conclusões

Todos os isolados de trichoderma testados são eficientes no controle da contaminação fúngica dos diásporos de *G. polymorpha* pela técnica *in vitro* do papel celofane. Com a aplicação desta técnica utilizando-se meio de cultura ágar-água + BD não é possível avaliar os efeitos dos isolados na promoção da germinação *in vitro* das sementes da espécie.

O isolado 2B22 e o produto Agrotich[®] são os mais eficientes no teste de pareamento de cultura no antagonismo a *Bipolaris* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Phoma* sp. Os isolados TSM1 e TSM2, com exceção de *Bipolaris* sp., também são eficientes nesse teste no antagonismo aos referidos fungos. Já o isolado 2B2 apresenta eficiência somente no antagonismo a *Alternaria* sp. e *Cladosporium* sp.

Tanto em substrato autoclavado quanto em não autoclavado, trichoderma não interfere na emergência das plântulas, mas os isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum* promove o crescimento vegetativo de *G. polymorpha*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, D. C. A. de; NOGUEIRA, A. C.; MEDEIROS, A. C. de. Efeito do substrato e da temperatura na germinação de sementes de cataia (*Drimys brasiliensis* Miers. Winteraceae). **Revista Brasileira de Sementes**. v.27, n.1, p. 149-157, 2005.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic, 2005, 922 p.
- ALMANÇA, M. A. K. **Trichoderma sp. no controle de doenças e na promoção do crescimento de plantas de arroz**. 2005. 81 f. Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.7, p. 2926-2933, 1999.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Fundamentos da biologia moderna**. vol. único. 4 ed. São Paulo: Moderna, 2006.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 161, p. 105-121, 2009.
- ARAÚJO, E.; ROSSETTO, E. A. Doenças e injúrias de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. da S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987, p. 146-161.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico**. Instituto Souza Cruz: Pallotti, 2002. p. 70.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2006.
- BARRETO, S. da S.; REZENDE, D. V. de; BLUM, L. E. B. Fungos em sementes de plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 33, n.3, p. 561-573, 2011.

BASTOS, C. N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991.

BAUGH, C. L.; ESCOBAR, C. L. B. The genus *Bacillus* and genus *Trichoderma* for agricultural bio-augmentation. **Rice Farm Magazine**. Feb., 2007.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n.4, p. 379-382, 1982.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**. v.7, n.4, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. (Boletim Técnico, n.5).Brasília: Embrapa, 1991. p.1-5.

BITENCOURT, L. F.; HOMECHIN, M. Avaliação da qualidade sanitária de sementes de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz – Flacourtiaceae) por três métodos de incubação. **Revista Brasileira de Sementes**. v.20, n.1, p. 233-236, 1998.

BORGHETTI, F. Dormência embrionária. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 109–123.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 209–222.

BOTELHO, L. da S. **Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*), ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), aroeira-pimenteira (*Schinus terebinthifolius*) e aroeira-salsa (*Schinus molle*): incidência, efeitos na germinação, transmissão para plântulas e controle**. 2006. 115f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 2006.

BOTELHO, L. da S.; MORAES, M. E. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**. v.34, n.4, p. 343-348, 2008.

BRANCALION, P. H. S.; NOVEMBRE, A. D. da L. C.; RODRIGUES, R. R. Temperatura ótima de germinação de sementes de espécies arbóreas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**. v.32, n.4, p. 15-21, 2010.

BRANCALION, P. H. S.; NOVEMBRE, A. D. da L. C.; RODRIGUES, R. R.; CHAMMA, H. M. C. P. Efeito da luz e de diferentes temperaturas na germinação de sementes de *Heliocarpus popayanensis* L. **Revista Árvore**. v.32, n.2, p. 225-232, 2008.

BRASIL. Lei Federal nº 4771 de 15 de setembro de 1965. **Institui o novo código florestal**. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L4771.htm>. Acesso em 26 jan 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009.

BRYANT, J. A. **Fisiologia da semente**. Temas de biologia. v.31. São Paulo: EPU, 1989. 85p.

CALDAS, L. S. Pomares de sementes de espécies nativas as funções das redes de sementes. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. (Coords). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 227–241.

CAMARGO, R. F. de. **Tratamentos alternativos na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de espécies florestais**. 2007. 75 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

CARNEIRO, J. S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. da S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 386-394.

CARVALHO, N. M. de; NAKAGAVA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. ed. rev. Campinas, Fundação Cargill, 1988. 424 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa – SPI, 1994. p. 265 – 269.

_____. **Espécies arbóreas brasileiras**. v. 1. Brasília: Embrapa, 2003. p. 274-280.

CASTRO, R. D. de.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004a. p. 149–162.

CASTRO, R. D. de; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004b. p. 51–67.

CHEROBINI, E. A. I. **Avaliação da qualidade de sementes e mudas de espécies florestais nativas**. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUES, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. v.149, n.3, p.1579–1592, 2009.

CORRÊA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. **Cultivo Agroecológico de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006. 76 p.

DELGADO, G. V.; MARTINS, I.; MENÊZES, J. E.; MACEDO, M. A.; MELLO, S. C. M. **Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro***. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J. J.; FILHO, J. da C. **Tratamento de sementes (controle de patógenos)**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1980. 121 p.

DINIZ, K. A.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; CARVALHO, M. L. M. de; MACHADO, J. da C. Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**. v.28, n.3, p. 37-43, 2006.

DONOSO, E. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* em viveiro. **Bosque**. v.29, n.1, p. 52-57, 2008.

ETHUR, L. Z. **Avaliação de fungos como antagonistas para o biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em pepineiro cultivado em estufa**. 2002. 155f. Dissertação. (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro.** 2006. 155f. Tese. (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F. da; STEFANELO, D. R.; ROCHA, E. k. da. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira.** v.30, n.2, p. 127-133, 2005.

ETTORI, L. de C.; FIGLIOLIA, M. B.; SATO, A. S. Conservação *ex situ* dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: situação atual no instituto florestal. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. (Coords). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas.** Curitiba: FUPPEF, 2006. p. 203–225.

FARIAS, C. R. J.; LUCCA-FILHO, O. A.; PIREEOBOM, C. R.; DEL PONTE, E. M. Qualidade sanitária de sementes de aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.) produzidas no estado do Rio Grande do Sul, safra 1999/2000. **Revista Brasileira de Sementes.** v.24, n.1, p. 1-4, 2002.

FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia.** Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 p.

FERREIRA, A. G. Interferência: competição e alelopatia. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 251–262.

FERREIRA, A. G.; CASSOL, B.; ROSA, S. G. T. da; SILVEIRA, T. S. da; STIVAL, A. L.; SILVA, A. A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul. **Acta Botânica Brasileira.** v.15, n.2, p. 231-242, 2001.

FIGLIOLIA, M. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. **Manejo de sementes de espécies arbóreas.** Série Registros. n. 15. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Florestal de São Paulo, 1995. 56p.

FIGLIOLIA, M. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; NOGUEIRA, E. de S. Controle de qualidade de sementes florestais: propostas de parâmetros técnicos. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. (orgs) **Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais.** Seropédica: EDUR, 2007. p. 143–187.

FILHO, M. R. C.; MELLO, S. C. M. de; SANTOS, R. P. dos; MENÊZES, J. E. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro*

e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 226**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

FLORES, A. V. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FORTES, F. de O.; SILVA, A. C. F. da; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**. v.31, n.2, p. 221-228, 2007.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2008 – 2010**. São Paulo, 2001. Disponível em: <http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas_2008-10_relatorio%20final_versao2_julho2011.pdf>. Acesso em 26 jan 2012.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Controle físico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995.

GLUFKE, C. **Espécies florestais recomendadas para recuperação de áreas degradadas**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 1999. 48 p.

GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D. C (Asteraceae). **Acta Botânica Brasileira**. v.16, n.4, p. 421-427, 2002.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**. v.39, p. 1968–1977, 2007.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**. v.84, n.4, p. 376–393, 2000.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p. 43–56, 2004a.

HARMAN, G. E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A.; CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on

diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Plant Physiology**. v.94, n.2, p. 146-153, 2004b.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. 2 ed. Documentos 264. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52p.

HILGEMBERG, P.; DALLA PRIA, M.; DUDA, L.; SANDINI, F.; KAMIKOGA, A. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Trichotecium roseum* a fungos de solo. **Fitopatologia Brasileira**. v.32, suplemento, p.121, agos 2007.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**. n.87, v.1, p. 4-10, 2003.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**. v.51. p. 409–416, 2009.

HWANG, J.; BENSON, D. M. Biocontrol of *Rhizoctonia* stem and root rot of poinsettia with Burkholderia and binucleate *Rhizoctonia*. **Plant Disease**. v.86, p. 47-53, 2002.

INBAR, M. J.; ABRAMSKY, D. C.; CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**. v.100, n.5, p. 337-346, 1994.

INMETRO; IDEC. **Meio ambiente e consumo**. Coleção Educação para o Consumo Responsável. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor. 2002. 76 p.

INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Infoclima**. Centro de previsão de tempo e estudos climáticos. 2010, 2011. Disponível em <<http://infoclima.cptec.inpe.br/>>. Acesso em 29 jan 2012.

JUNIOR, L. S.; WENDLING, I.; CUNHA, A. C. M. C. M. da; ROSA, L. S. da; QUOIRIN, M. **Substratos e planta matriz na sobrevivência e crescimento de mudas de cambará**. Comunicado Técnico 148. Embrapa Florestas, 2005.

JYOTSNA; SRIVASTAVA, A.; SINGH, R. P.; SRIVASTAVA, A. K.; SAXENA, A. K.; ARORA, D. K. Growth promotion and charcoal rot management in chickpea by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Plant Protection Research**. v.48, n.1, 2008.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**. v.144, p. 267-272, 1992.

KRUGER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: FILHO, A. B. et al. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 46–95.

KRUPPA, P. C.; RUSSOMANNO, O. M. R. **Fungos em plantas medicinais, aromáticas e condimentares – solo e semente**. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/Fungos/index.htm>. Acesso em: 24 mai 2011.

KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. **Fitopatologia Brasileira**. v.30, n.2., p. 164-168, 2005.

LAZAROTTO, M. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cedro e patogenicidade de *Rhizoctonia* spp.** 2010. 90 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

LIMA JUNIOR, M. de J. V. (ed). **Manual de procedimentos para análise de sementes florestais**. Manaus: UFAM, 2010. 146 p.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.15-28.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998. p. 89.

LORZA, R. F.; SOUZA, F. M. de; NAKASHIMA, R. Pomares de sementes de espécies nativas – situação atual. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPRF, 2006. p. 41-64.

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; JÚNIOR, M. L.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes ecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota neotropica**. Programa Biota Fapesp. v.9, n.3, p. 145–149, 2009.

LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. da S. (Ed). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.

LUCON, C. M. M. **Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp.** 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm>. Acesso em 31 mai 2010.

LUZ, W. C. da. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**. v.26, n.1, p. 16-20, 2001.

MACEDO, E. de C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência da embalagem e do armazenamento na qualidade sanitária de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**. v.24, n.1, p. 42-50, 2002.

MACHADO, C. F.; OLIVEIRA, J. A. de; DAVIDE, A. C.; GUIMARÃES, R. M. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson). **Cerne**. v.8, n.2, p. 17-25, 2002.

MACHADO, J. da C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. P. 371-419.

MAGALHÃES, H. M.; CATÃO, H. C. R. M.; SALES, N. de L.; LIMA, N. F. de; LOPES, P. S. N. Qualidade sanitária de sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no Norte de Minas Gerais. **Ciência Rural**. v.38, n.8, p. 2371-2374, 2008.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

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

MARTINELLI-SENEME, A.; POSSAMAI, E.; SCHUTA, L. R.; VANZOLINI, S. Germinação e sanidade de sementes de *Bauhinia variegata*. **Revista Árvore**. v.30, n.5, p. 719-724, 2006.

MARTINS, C. C.; MACHADO, C. G.; NAKAGAWA, J. Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) (Leguminosae)). **Revista Árvore**. v.32, n.4, p.633-639, 2008.

MARZINEK, J. **Aspectos estruturais de órgãos reprodutivos de seis espécies de Eupatorieae (Asteraceae), com ênfase na ontogênese das cipselas e sementes**. 2008. 99 f.

Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas – Botânica) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

MARZINEK, J.; DE-PAULA, O. C.; OLIVEIRA, D. M. T. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. **Revista Brasileira de Botânica**. v.31, n.3, p. 549-553, 2008.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. v.1. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 17-60.

MELO, I. S. de. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.4, p. 261-295, 1996.

MELO, I. S. de.; FAULL, J. L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v.57, n.1, p. 55-59, 2000.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* sp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991, p. 7-23.

MELO, P. R. B. de; OLIVEIRA, J. A.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M. de; VIEIRA, A. R.; EVANGELISTA, J. R. E. Germinação de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Pinaster) armazenados em diferentes condições. **Ciência e Agrotecnologia**. v.31, n.1, p. 75-82, 2007.

MENEZES, N. L.; FRANZIN, S. M.; ROVERSI, T.; NUNES, E. P. Germinação de sementes de *Salvia splendens* Sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. **Revista Brasileira de Sementes**. v.26, n.1, p. 32-37, 2004.

MENTEN, J. O. M.; BUENO, J. T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. da S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 164-191.

MONDO, V. H. V.; BRANCALION, P. H. S.; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D. da L. C.; NETO, D. D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. v.30, n.2, p. 177-183, 2008.

MORAES, M. L. T. de.; MORI, E. S.; RODRIGUES, C. J. Delineamento de pomar multiespécies. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. (Coords). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 183-202.

MORANDI, M. A. B. Integração de métodos físicos e biológicos no controle de doenças em viveiros de plantas medicinais: estudo de caso com *Cordia verbenácea*. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas** (editores). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 336-341.

MUNIZ, M. F. B.; SILVA, L. M. e; BLUME, E. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**. v.29, n.1, p. 140-146, 2007.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, 1994. p. 49-86.

NASCIMENTO, P. K. V. do; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**. v.5, supl.2, p. 141-143, 2007.

NASCIMENTO, W. M. O. do; CRUZ, E. D.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**. v.28, n.1, p.149-153, 2006.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. Fatores externos (ambientais) e internos que influenciam na germinação de sementes. **Informativo Sementes IPEF**. Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. São Paulo, 1998. Acesso em 26 mai 2010. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>>.

NEERGARD, P. **Seed pathology**. v.1. London: The MacMillan Press, 1979. 839 p.

NETO, S. N. de O.; SILVA, J. de A. Áreas protegidas e a produção de sementes florestais sob o ponto de vista legal. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. (Orgs). **Parâmetros Técnicos para Produção de Sementes Florestais**. Seropédica: UFRRJ, 2007. p. 35-48.

NÓBREGA, L. H. P.; CORRÊA JUNIOR, C.; RODRIGUES, T. J. D.; CARREGARI, S. M. J. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de camomila (*Matricaria recutita*). **Revista Brasileira de Sementes**. v.17, n.2, p. 137-140, 1995.

OLIVEIRA, G. G. de. **Trichoderma spp. no crescimento vegetal e no biocontrole de Sclerotinia sclerotiorum e de patógenos em sementes de cártamo (Carthamus tinctorius)**. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

OLIVEIRA, L. M. de.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. de. Teste de germinação de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert – Fabaceae. **Revista Floresta**. v.38, n.3, p. 545–551, 2008.

OLIVEIRA, L. M. de.; CARVALHO, M. L. M. de.; SILVA, T. T. de A.; BORGES, D. I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich – Bignoniaceae. **Ciência e Agrotecnologia**. v.29, n.3, p.642-648, 2005.

OUSLEY, M. A.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Effect of Trichoderma on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**. v.26, p.277-285, 1993.

OZBAY, N.; NEWMAN, S. E.; BROWN, W. M. The effect oh the *Trichoderma harzianum* strains on the growth of tomato seddlings. **Acta Horticola**. v.635, p.131-134, 2004.

PACHECO, M. V.; MATOS, V. P.; FERREIRA, R. L. C.; FELICIANO, A. L. P.; PINTO, K. M. S. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.(Anacardiaceae). **Revista Árvore**. v.30, n.3, p. 359–367, 2006.

PADULLA, T. L.; MORAES, M. H. D. de; BARBEDO, C. J.; BORGES, I. F.; MENTEN, J. O. M.; PASCHOLATI, S. F. Detecção de fungos em sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) coletadas durante sua formação e dispersão. **Revista Brasileira de Sementes**. v.32, n.2, p. 154-159, 2010.

PEDROSO, D. C. **Associação de *Alternaria* spp. com sementes de apiáceas: métodos de inoculação e influência na qualidade fisiológica**. 2009. 118 f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283–297.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FREIRE, J. M.; SILVA, L. D. Parâmetros genéticos para colheita de sementes de espécies florestais. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. (Orgs). **Parâmetros Técnicos para Produção de Sementes Florestais**. Seropédica: UFRRJ, 2007a. p. 51–102.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; NOGUEIRA, E. de S.; PEIXOTO, M. C. Estado da arte da pesquisa em tecnologia de sementes de espécies florestais da Mata Atlântica. In: PIÑA-

RODRIGUES, F. C. M. et al. (Orgs). **Parâmetros Técnicos para Produção de Sementes Florestais**. Seropédica: UFRRJ, 2007b. p. 105–141.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. da S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (editores). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 238–244.

REGO, S. S.; NOGUEIRA, A. C.; KUNIYOSHI, Y. S.; SANTOS, A. F. dos. Germinação de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. em diferentes substratos e condições de temperaturas, luz e umidade. **Revista Brasileira de Sementes**. v.31, n.2, p. 212-220, 2009.

REIS, A; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**. v.21, n.1, 1995.

REITZ, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Fascículo Compostas. Itajaí: Conselho Nacional de Pesquisas – Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1973. p. 29–35.

RESENDE, M. de L.; OLIVEIRA, J. A. de.; GUIMARÃES, R. M.; PINHO, R. G. V.; VIEIRA, A. R. Inoculações de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**. v.28, n.4, p. 793-798, 2004.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 172 p.

ROSA, S. G. T. da; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta Botânica Brasileira**. v.15, n.2, p. 147-154, 2001.

SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**. v.14, n.2, p. 13-20, 2004.

SANTOS, D. L. dos; SUGAHARA, V. Y.; TAKAKI, M. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich, *Tabebuia crysotricha* (Mart. ex DC) Standl. e *Tebebuia róseo-alba* (Ridl) Sand – Bignoneaceae. **Ciência Florestal**. v.15, n.1, p. 87-92, 2005.

SANTOS, F. E. M. dos; SOBROSA, R. de C.; COSTA, I. F. D.; CORDER, M. P. M. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Ciência Florestal**. v.11, n.1, p. 13-20, 2001.

SILVA BELLO, E. P. de B. C.; ALBUQUERQUE, M. C. de F. e.; GUIMARÃES, S. C.; MENDONÇA, E. A. F. de. Germinação de sementes de *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Sm. submetidas a diferentes condições de temperatura e de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Sementes**. v.30, n.3, p. 16–24, 2008.

SILVA, A. C. F. da. **Uso da radiação gama para obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai e *Trichoderma viride* Pers.: Fr. com capacidade melhorada no controle ao *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.** 1997. 143f. Tese. (Doutorado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura/CENA) Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

SILVA, F. de A. S. e; AZEVEDO, C. A. V. de. **Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, L. D.; HIGA, A. R. Planejamento e implantação de pomares de sementes de espécies florestais nativas. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. (Coords). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas.** Curitiba: FUPEF, 2006. p. 13–39.

SILVA, L. M. de M.; RODRIGUES, T. de J. D.; AGUIAR, I. B. de. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Árvore**. v.26, n.6, p. 691-697, 2002.

SNEH, B.; ICHIELEVICH-AUSTER, M. Induced resistance of cucumber seedlings caused by some non-pathogenic *Rhizoctonia* (np-R) isolates. **Phytoparasitica**. v.26, n.1, p. 27-38, 1998.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A. (Org.) **Flora arbórea e arborecente do Rio Grande do Sul, Brasil.** São Carlos: Rima: Novo Ambiente, 2006.p. 95.

STADNIK, M.J.; BETTIOL, W. Controle biológico de oídeos. In: MELO, I. S. de. AZEVEDO, J. L. de. (editores). **Controle biológico**. v.3. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 95–112.

STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; MACARI, P. A. T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.4, p. 525–530, 2006.

TAVARES, G. M. **Podridão do pé do mamoeiro: infestação de solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e *Trichoderma* e avaliação dos mecanismos de**

defesa envolvidos. 2009. 121f. Tese. (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

THE PLANT LIST. **A working list of all plant species.** 2010. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl/record/gcc-130284>>. Acesso em 23 jan. 2012.

VECHIATO, M. H. **Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas.** 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_3/SementesFlorestais/index.htm>. Acesso em: 24 mai 2011.

VIEIRA, A. H.; MARTINS, E. P.; PEQUENO, P. L. de L.; LOCATELLI, M.; SOUZA, M. G. de. **Técnicas de produção de sementes florestais.** Rondônia: Embrapa CPAF, 2001.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. **Testes de vigor em sementes.** Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 31-47.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas.** Dados eletrônicos. Documentos 130. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 55p.

WETZEL, M. M. V. da S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. da S. **Patologia de sementes.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 260-274.

WIELEWICKI, A. P.; LEONHARDT, C.; SCHLINDWEIN, G.; MEDEIROS, A. C. de S. Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes.** v.28, n.3, p. 191-197, 2006.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil.** v.235, p. 235–242, 2001.

ZAIDAN, L. B. P.; BARBEDO, C. J. Quebra de dormência em sementes. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 135–146.