

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES  
DE MILHO, FEIJÃO, NABO FORRAGEIRO E AVEIA  
PRETA.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Emanuele Junges**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**



# **TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO, FEIJÃO, NABO FORRAGEIRO E AVEIA PRETA.**

**Emanuele Junges**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlove Fátima Brião Muniz**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Junges, Emanuele  
TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO,  
FEIJÃO, NABO FORRAGEIRO E AVEIA PRETA. / Emanuele  
Junges.-2012.  
152 p.; 30cm

Orientador: Marlove Fátima Brião Muniz  
Coorientadores: Elena Blume, Stela Maris Kulczynski  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, RS, 2012

1. Microbiolização de sementes 2. Controle biológico 3.  
Patologia de sementes 4. Promoção de crescimento I.  
Muniz, Marlove Fátima Brião II. Blume, Elena III.  
Kulczynski, Stela Maris IV. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, Abaixo Assinada,  
Aprova a Dissertação de Mestrado

**TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO,  
FEIJÃO, NABO FORRAGEIRO E AVEIA PRETA.**

elaborada por  
**Emanuele Junges**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Agronomia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
**Marlove Fátima Brião Muniz, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora) - UFSM

  
\_\_\_\_\_  
**Ubirajara Russi Nunes, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Francisco Amaral Villela, Dr. (UFPEL)**

**Santa Maria, 28 fevereiro de 2012**



*“Aos meus pais, Mário e Julita,  
à minha irmã Mariane e ao pequeno Evandro.  
Devo tudo à vocês!”*





## AGRADECIMENTOS

*À Deus, pela força e fé para superar desafios.*

*Aos meus pais, modelo de dedicação, trabalho e caráter, os grandes responsáveis pela escolha do meu curso, e por instigarem minha curiosidade fazendo de mim uma pesquisadora.*

*À Universidade Federal de Santa Maria, por ser uma casa acolhedora nos últimos sete anos, ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade e a Capes pela concessão da bolsa de estudos.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação e participação fundamental na construção deste trabalho, pela confiança depositada em meu trabalho ao longo dos vários anos, pelo incentivo e exemplo a ser seguido e principalmente pela sua amizade.*

*Às professoras Elena Blume, amiga que me acompanha há muitos anos, e Stela Maris Kulczynski, co-orientadoras deste trabalho.*

*À minha equipe de trabalho: Bruna Bastos, Janaine Pedroso, Juceli Muller, Ricardo Feliciano, Daniele Pedroso, Cláudia Dutra, Geísa Finger, Letícia Frizzo, Rafael Cunha, Camila, Filipi Schirmer, que viabilizaram a realização deste trabalho.*

*Meu obrigado especial à Bruna Bastos, por toda a dedicação em todas as etapas do trabalho, de início ao fim, que mesmo sem obrigação formal assumiu com enorme responsabilidade e dedicação as inúmeras tarefas apresentadas.*

*Janaíne Voll Pedroso, cuja participação e dedicação foram fundamentais em grande parte deste trabalho, muito obrigada!*

*A todos os colegas do Laboratório de Fitopatologia, Miria, Paola, Graziela, Marília, Caciara, Tales, Fábio, Johnathan, Ricardo M., Clair, Lilian, Leise, Gerarda, Jeferson, Isabel, Saulo, Marcieli, Gisele, Fernanda e Iana.*

*Aos funcionários do Departamento, Maria Nevis, Fernando e Mari, pela pronta disponibilidade em auxiliar.*

*À Rodrigo Tascheto Machado pelo companheirismo e apoio, e a sua família pela acolhida carinhosa.*

*A todos que de um modo ou outro fizeram parte desta caminhada, estando ao meu lado e oferecendo apoio.*

*Muito obrigada!*

*“Não corra atrás das borboletas...  
Cuide do jardim para que elas venham até você.”*

*Mário Quintana*



## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brasil

### TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO, FEIJÃO, NABO FORRAGEIRO E AVEIA PRETA.

AUTORA: EMANUELE JUNGES  
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ  
LOCAL E DATA DA DEFESA: SANTA MARIA, 28 DE FEVEREIRO DE 2012.

O objetivo deste trabalho foi potencializar o efeito da microbiolização de sementes de milho, feijão, nabo forrageiro e aveia preta com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização. A microbiolização das sementes com suspensão de estruturas biológicas foi realizada com os produtos comerciais Agrotich<sup>®</sup> plus e Rhizoliptus<sup>®</sup>. A restrição hídrica foi realizada em meio BDA + Manitol, para *Trichoderma* spp. ou para *Bacillus subtilis*, em cada placa foram distribuídas sementes de cada cultura previamente desinfestadas. Na protrusão radicular na primeira semente, as demais foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h. A peliculização foi realizada com a adição do polímero Color Seed<sup>®</sup> à calda de tratamento contendo *Trichoderma* spp. ou ao produto Rhizoliptus. As sementes foram secas por 48 h em ambiente de laboratório. Foi utilizado um tratamento associando a peliculização e a restrição hídrica nas sementes microbiolizadas com os organismos e a associação deles. O desempenho dos tratamentos foi avaliado por um conjunto de testes realizados em laboratório, casa de vegetação e à campo. *Trichoderma* spp. controla patógenos associados, e possui boa associação com as sementes utilizadas. *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* promovem o crescimento o desenvolvimento de plântulas e plantas, tendo resposta variável conforme a técnica de microbiolização utilizada. Em condições do teste de germinação em rolo a associação de *Trichoderma* spp. com as sementes se torna patogênica, entretanto quando os testes são conduzidos em substrato ou solo esses malefícios não são reproduzidos.

**Palavras chave:** Polímero. Manitol. Germinação. Sanidade.



## **ABSTRACT**

Master of Science Dissertation  
Graduate Program in Agronomy  
Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brazil

### **TECHNICAL MICROBIOLIZATION SEED CORN, BEANS, FORAGE RADISH AND BLACK OAT.**

AUTHOR: EMANUELE JUNGES

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

LOCATION AND DATE OF PRESENTATION: SANTA MARIA, 28 DE FEBRUARY DE 2012.

The objective of this study was the effect of leverage microbiolization seed corn, beans, forage radish and black oat with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* by physiological conditioning techniques, suspension of biological structures and film coating. The microbiolization seeds without additional technique was carried out with commercial products Rhizoliptus® and Agrotich plus ®. Fluid restriction was held in Manitol + PDA medium for *Trichoderma* spp. or *Bacillus subtilis*, were distributed on each plate of each seed culture previously disinfected. When was the first seed radicle protrusion in the other were removed and dried in a laboratory environment for 48 h. The film coating was performed with the addition of the polymer Color Seed ® treatment the syrup containing *Trichoderma* spp. or product Rhizoliptus. The seeds were dried for 48 h in a laboratory environment. We used a treatment associating film coating and fluid restriction in seed microbiolization with the bodies and their association. The performance of the treatments was assessed by a set of tests in laboratory, greenhouse and field. *Trichoderma* spp. pathogens associated controls, and has good association with the seeds used. *Trichoderma* spp. and *B. subtilis* growth promoting the development of seedlings and plants, with variable response depending on the technique used microbiolization. Under conditions of the germination test roll the association of *Trichoderma* spp. with the seeds becomes pathogenic, however when tests are conducted on a substrate or soil these harms are not played.

**Key words:** Polymer. Mannitol. Germination. Sanity.





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus subtilis</i> em meio de cultura BDA, sob diferentes restritores e potenciais. ....	50
Tabela 2 - Teores de argila, matéria orgânica (MO), pH em água, saturação por bases (V), fósforo extraído pelo método Mehlich-1 (P) e potássio (K), e suas interpretações. ....	62
Tabela 3 - Médias (%) de plântulas normais aos quatro dias (PN 4d), plântulas normais aos sete dias (PN 7d), sementes mortas (SMO) e plântulas anormais (PAN) de sementes de milho condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol em diferentes potenciais hídricos.....	63
Tabela 4 – Incidência (%) de <i>Trichoderma</i> spp. (TRI), <i>Fusarium</i> spp. (FUS), <i>Penicillium</i> spp. (PEN) em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos .....	65
Tabela 5 – Médias (%) primeira contagem de germinação (PCO), plântulas fortes (NFO), plântulas fracas (NFR), plântulas anormais (PAN), teste de frio (TFR) de sementes de milho submetidas à diferentes tratamentos. ....	67
Tabela 6 - Teores de argila, matéria orgânica (MO), pH em água, saturação por bases (V), fósforo extraído pelo método Mehlich-1 (P) e potássio (K), e suas interpretações.....	84
Tabela 7 - Médias (%) de plântulas normais aos cinco dias (PN 5d), plântulas normais aos nove dias (PN 9d), sementes mortas (SMO) e plântulas anormais (PAN) de sementes de feijão condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol em diferentes potenciais hídricos.....	86
Tabela 8 - Incidência (%) de <i>Trichoderma</i> spp. (TRI), <i>Fusarium</i> spp. (FUS), <i>Penicillium</i> spp. (PEN) em sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos .....	87
Tabela 9 - Médias (%) da primeira contagem de germinação (PCO), plântulas fortes (PFO), plântulas fracas (PFR), teste de frio (TFR) de sementes de feijão submetidas à diferentes tratamentos. ....	90
Tabela 10 – Médias do comprimento de parte aérea (CPA) (cm), massa seca de parte aérea (MAS) (mg), largura da primeira folia trofoliolada (TRF) (cm), massa seca de raiz (MRA) (mg) mensurados em plântulas cultivadas em canteiro e em copos em casa de vegetação produzidas a partir de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos. ....	96
Tabela 11 - Teores de argila, matéria orgânica (MO), pH em água, saturação por bases (V), fósforo extraído pelo método Mehlich-1 (P) e potássio (K), e suas interpretações.....	110
Tabela 12 - Médias (%) de plântulas normais aos quatro dias (PN 4d), plântulas normais aos dez dias (PN 10d), sementes mortas (SMO) e plântulas anormais (PAN) de sementes de nabo forrageiro condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol em diferentes potenciais hídricos. ....	111
Tabela 13 - Incidência (%) de <i>Trichoderma</i> spp. (TRI), <i>Fusarium</i> sp. (FUS), <i>Alternaria</i> sp. (ALT) em sementes de nabo forrageiro submetidas a diferentes tratamentos .....	113

Tabela 14 - Médias (%) da primeira contagem (PCO), plântulas normais (PNO), plântulas fracas (PFR) e plântulas anormais (PAN) de sementes de nabo forrageiro submetidas à diferentes tratamentos.....	115
Tabela 15 - Médias de comprimento de raiz (CRA), comprimento total (CTO), largura da primeira folha verdadeira (LFO), índice de velocidade de emergência (IVE) em plântulas cultivadas em casa de vegetação oriundas de sementes de nabo forrageiro submetidas a diferentes tratamentos ....	118
Tabela 16 - Teores de argila, matéria orgânica (MO), pH em água, saturação por bases (V), fósforo extraído pelo método Mehlich-1 (P) e potássio (K), e suas interpretações.....	134
Tabela 17 - Médias (%) de plântulas normais aos quatro dias (PN 4d), plântulas normais aos dez dias (PN 10d), sementes mortas (SMO) e plântulas anormais (PAN) de sementes de aveia preta submetidas à diferentes tratamentos. ....	135
Tabela 18 - Incidência (%) de <i>Trichoderma</i> spp. (TRI), <i>Fusarium</i> sp. (FUS), <i>Penicillium</i> sp (PEN), <i>Aspergillus</i> sp. (ASP) em sementes de aveia preta submetidas a diferentes tratamentos.....	137
Tabela 19 - Médias (%) da primeira contagem de germinação (PCO), plântulas fortes (PFO), plântulas fracas (PFR), plântulas anormais (PAN) de sementes de aveia preta submetidas à diferentes tratamentos. ....	139
Tabela 20 - Médias da emergência (EMG), índice de velocidade de emergência (IVE), número médio de folhas (NFO), diâmetro do colo (DCO), número médio de plântulas com presença de perfilhos (PPF), comprimento médio do perfilho (CPF), comprimento de parte aérea de plântulas (CPA), comprimento de raiz (CRA), massa seca de parte aérea (MPA) mensuradas em plântulas cultivadas em casa de vegetação oriundas de sementes de aveia preta sob diferentes tratamentos .....	143

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática da formação de endósporo em uma célula da bactéria *B. subtilis* quando as condições nutricionais são limitantes.....25
- Figura 2 - Diagrama esquemático do fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR), ocasionada pelo agente de biocontrole *B. subtilis*. Este ao entrar em contato com o tecido da planta incita a geração de sinais bioquímicos celulares, que estimulam o aumento da concentração de ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET). Em seguida, ocorre a transcrição de genes de defesa responsáveis pela expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs).....27
- Figura 3 - Representação esquemática das rotas de sinalização desencadeada por patógenos e *B. subtilis* ou agentes de biocontrole. O patógeno atua desencadeando a biossíntese do ácido salicílico (AS), que irá promover a resistência sistêmica adquirida (SAR). Em contra partida, a bactéria inicia a biossíntese de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) que irá promover a resistência sistêmica induzida (ISR). Ambas as rotas de sinalização são governadas pela proteína NPR1.. .....28
- Figura 4 - A: Avaliação do crescimento micelial de *Trichoderma* spp. com quatro medidas diametralmente opostas em meio de cultura com diferentes restritores e diferentes potencias hídricos; B: Crescimento de colônia de *Bacillus subtilis* em meio de cultura com diferentes restritores e diferentes potencias hídricos.....49
- Figura 5 - Protrusão radicular em sementes de milho (*Zea mays*) condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto Manitol. ....58
- Figura 6 - Percentual de germinação e de sementes mortas de milho submetidas a diferentes tratamentos.....66
- Figura 7 - Comprimento e massa seca de parte aérea de plântulas de milho oriundas do teste de germinação, submetidas a diferentes tratamentos .....69
- Figura 8 - Número de folhas e massa seca de parte aérea de plântulas de milho cultivadas em canteiro submetidas a diferentes tratamentos .....70
- Figura 9 - Protrusão radicular em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto Manitol.....79
- Figura 10 - Infecção de *Rhizoctonia solani* em sementes de feijão preto Lote 1. A – Sementes em meio de cultura BDA com crescimento do patógeno. B, C – Vista em lupa do crescimento micelial sobre as sementes. D – Vista em microscópio do micélio característico de *Rhizoctonia solani*.....85
- Figura 11 - Percentual de germinação e sementes mortas no teste de germinação de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos.....89
- Figura 12 - Comprimento de plântulas do teste de germinação de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos. ....91
- Figura 13 - Massa seca de parte aérea e raiz de plântulas do teste de germinação de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos.....92
- Figura 14 - Emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas oriundas de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos, cultivadas em copos plásticos em casa de vegetação .....93

Figura 15 - Comprimento e massa seca de parte aérea plântulas oriundas de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos, cultivadas em copos plásticos em casa de vegetação. ....	94
Figura 16 - Protrusão radicular em sementes de nabo ( <i>Raphanus sativus</i> L.) condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto Manitol....	105
Figura 17 - Percentual de germinação e sementes mortas no teste de germinação de sementes de nabo forrageiro submetidas a diferentes tratamentos. ....	114
Figura 18 - Comprimento e massa seca de plântulas do teste de germinação de sementes de nabo forrageiro submetidas a diferentes tratamentos .....	116
Figura 19 - Altura média de plântulas de nabo forrageiro oriundas de sementes submetidas a diferentes tratamentos conduzidas à campo .....	119
Figura 20 - Protrusão radicular em sementes de aveia preta ( <i>Avena stringosa</i> ) condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto Manitol....	129
Figura 21 - Percentual de germinação e sementes mortas no teste de germinação de sementes de aveia preta submetidas a diferentes tratamentos.....	138
Figura 22 - Comprimento e massa seca de plântulas do teste de germinação de sementes de aveia preta submetidas a diferentes tratamentos.....	140
Figura 23 - Percentual de emergência de plântulas e massa seca de parte aérea de plantas de aveia preta oriundas de sementes submetidas a diferentes tratamentos conduzidas à campo. ....	144

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A – Análise de solo.....</b>	<b>151</b>
<b>Anexo B – Análise de solo. ....</b>	<b>152</b>



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
<b>A importância da semente no sistema de produção .....</b>	<b>21</b>
<b>Microbiolização de sementes .....</b>	<b>22</b>
<i>Trichoderma spp.</i> .....	23
<i>Bacillus subtilis</i> .....	25
<b>Condicionamento fisiológico .....</b>	<b>29</b>
<b>Pelculização .....</b>	<b>32</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>45</b>
<b>DETERMINAÇÃO DO RESTRITOR E DO POTENCIAL HÍDRICO ÓTIMO PARA Trichoderma spp. E Bacillus subtilis EM MEIO DE CULTURA BDA.....</b>	<b>45</b>
<b>1.1 Introdução .....</b>	<b>47</b>
<b>1.2 Material e métodos .....</b>	<b>48</b>
<b>1.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>49</b>
<b>1.4 Conclusões .....</b>	<b>50</b>
<b>1.5 Referências bibliográficas.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>53</b>
<b>TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO COM Trichoderma spp. E Bacillus subtilis.....</b>	<b>53</b>
<b>2.1 Introdução .....</b>	<b>55</b>
<b>2.2 Material e métodos .....</b>	<b>56</b>
2.2.1 – Determinação do potencial hídrico ótimo para sementes de milho.....	57
2.2.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos .....	58
2.2.3 – Aplicação dos tratamentos.....	58
2.2.4 – Avaliação dos tratamentos.....	60
<b>2.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>62</b>
2.3.1 – Determinação do potencial hídrico ótimo para sementes de milho.....	62
2.3.2 – Determinação da germinação antes da aplicação dos tratamentos .....	63
2.3.3 – Avaliação dos tratamentos.....	63
<b>2.4 Conclusões .....</b>	<b>71</b>
<b>2.5 Referências bibliográficas.....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>75</b>
<b>TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO COM Trichoderma spp. E Bacillus subtilis.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Introdução .....</b>	<b>77</b>
<b>3.2 Material e métodos .....</b>	<b>78</b>
3.2.1 – Determinação do potencial hídrico ótimo para sementes de feijão.....	79
3.2.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos .....	80
3.2.3 – Aplicação dos tratamentos.....	80
3.2.4 – Avaliação dos tratamentos.....	82
<b>3.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>84</b>

3.3.1 – Determinação do potencial hídrico ótimo para sementes de feijão .....	84
3.3.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos.....	86
3.3.3 – Avaliação dos tratamentos .....	86
<b>3.4 Conclusões.....</b>	<b>96</b>
<b>3.5 Referências bibliográficas .....</b>	<b>97</b>
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>101</b>
<b>TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE NABO FORRAGEIRO COM <i>Trichoderma</i> spp. E <i>Bacillus subtilis</i>.....</b>	<b>101</b>
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>103</b>
<b>4.2 Material e métodos.....</b>	<b>104</b>
4.2.1 – Determinação do potencial hídrico ótimo para sementes de nabo forrageiro.....	105
4.2.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos: .....	106
4.2.3 – Aplicação dos tratamentos .....	106
4.2.4 – Avaliação dos tratamentos .....	108
<b>4.3 Resultados e discussão .....</b>	<b>110</b>
4.3.1 – Determinação do potencial hídrico ótimo para sementes de nabo forrageiro.....	110
4.3.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos.....	111
4.3.3 – Avaliação dos tratamentos .....	112
<b>4.4 Conclusões.....</b>	<b>119</b>
<b>4.5 Referências bibliográficas .....</b>	<b>120</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>125</b>
<b>TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE AVEIA PRETA COM <i>Trichoderma</i> spp. E <i>Bacillus subtilis</i>.....</b>	<b>125</b>
<b>5.1 Introdução.....</b>	<b>127</b>
<b>5.2 Material e métodos.....</b>	<b>128</b>
5.2.1 – Determinação do potencial hídrico ótimo para sementes de aveia preta .....	129
5.2.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos.....	130
5.2.3 – Aplicação dos tratamentos .....	130
5.2.4 – Avaliação dos tratamentos .....	132
<b>5.3 Resultados e discussão .....</b>	<b>134</b>
5.3.1 – Determinação do potencial hídrico ótimo para sementes de aveia preta .....	134
5.3.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos.....	135
5.3.3 – Avaliação dos tratamentos .....	136
<b>5.4 Conclusões.....</b>	<b>144</b>
<b>5.5 Referências bibliográficas .....</b>	<b>145</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>151</b>



## INTRODUÇÃO GERAL

A maioria das espécies de plantas cultivadas são propagadas por sementes, as quais podem atuar como disseminadoras de fungos, bactérias, vírus e nematóides, além de introduzir doenças em novas áreas com conseqüências epidemiológicas. Assim como é importante o uso de sementes sadias, também é necessário que esses propágulos tenham boa capacidade germinativa e produzam plântulas vigorosas, capazes de garantir um adequado estabelecimento da população de plantas.

Buscando sementes de qualidade, a prática de tratar as sementes antes da semeadura está bem difundida e estabelecida, porém busca-se reduzir o uso de insumos químicos que possam trazer malefícios para o ambiente e/ou para organismos não alvo. Como alternativa, a microbiolização oferece resultados promissores. Vários são os relatos de utilizações bem sucedidas de biocontroladores em sementes, produzindo plântulas sadias e vigorosas, refletindo em plantas adultas mais produtivas. Entretanto, o meio agrícola ainda não está confiante na utilização dessa técnica, mesmo que os resultados sejam persistentes no ambiente, uma vez que os organismos utilizados sobrevivem no solo disponibilizando nutrientes para os ciclos das culturas subsequentes.

Entre os organismos de controle biológico de doenças de plantas passíveis de utilização para microbiolização de sementes se destacam *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*. *Trichoderma* spp. é um gênero fúngico que compreende diversas espécies que possuem conhecido potencial de controle sobre patógenos. Tem ampla adaptação se inoculado no solo, colonizando principalmente a rizosfera das plantas e conferindo proteção desde a semente até a planta adulta. De mesmo modo, *Bacillus subtilis* se destaca por atuar em diversos patossistemas e pela ação como promotor de crescimento e indutor de resistência em diversas plantas. Ambos os organismos adaptam-se à produção massal e se desenvolvem em meio de cultivo viabilizando e ampliando as possíveis formas de microbiolização.

Os resultados da microbiolização de sementes registrados na literatura são variáveis, sendo algumas culturas mais responsivas que outras e, ainda, a mesma cultura apresentando resposta diferente para organismos diversos. Essas disparidades não estão bem esclarecidas, necessitando de investigação adicional,

visto que podem estar correlacionadas com o organismo e/ou com a metodologia utilizada na microbiolização ou, ainda, com a cultura submetida a esse processo.

Como ferramentas para potencializar o efeito da microbiolização pode se fazer uso de técnicas utilizadas para aplicação de produtos químicos às sementes, como a peliculização, ou técnicas de condicionamento fisiológico, que melhoram a germinação e o desempenho das plântulas.

O condicionamento fisiológico preconiza a exposição das sementes a uma condição de umidade em que as sementes iniciem o processo germinativo, entretanto, a disponibilidade de água seja limitada, para que não ocorra a protrusão da radícula. Sementes sob estas condições absorvem água mais lentamente, levando mais tempo para concluir as fases do processo germinativo, e assim que colocadas sob condições favoráveis retomam a germinação de maneira mais uniforme e vigorosa. O maior tempo até iniciar a germinação permite que as sementes fiquem expostas a organismos, como fungos e bactérias patogênicos, até que ocorra infecção e não apenas infestação externa da cobertura protetora. Isso aponta para a possibilidade de associação com organismos benéficos, como *Trichoderma spp.* e *Bacillus subtilis*, que sob maior e mais intenso contato produzem efeitos mais pronunciados sobre as sementes e plântulas.

De mesmo modo, a peliculização foi concebida para propiciar maior aderência de produtos químicos às sementes, mas os mesmos benefícios podem ser obtidos para produtos biológicos. Maior aderência, sem perda do produto durante o manuseio, mas também sem que haja perda de viabilidade dos organismos.

Diante deste contexto, a microbiolização de sementes ganha destaque especial, pois permite a redução da utilização de defensivos químicos através da utilização de organismos biológicos no controle de patógenos associados às sementes, proteção das plântulas em fase inicial, colonização do solo rizosférico, indução de resistência que propicia proteção por todo ciclo de cultivo. Aliado a isso, há relatos de promoção de crescimento e desenvolvimento das plantas inoculadas, refletindo em maior número de folhas, assim como maior número de raízes e com maior capacidade de absorção de nutrientes. Ganhos secundários são observados no solo, na ação sobre nutrientes indisponíveis, que doravante passam a estar facilmente disponíveis e melhorias na qualidade estrutural. A aplicação destes organismos via semente possibilita ainda, a associação com outras técnicas, como o condicionamento fisiológico e a peliculização.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi potencializar o efeito da microbiolização de sementes com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*, por meio de técnicas de inoculação: suspensão de esporos ou células bacterianas; restrição hídrica e peliculização, sobre sementes de milho, feijão, nabo forrageiro e aveia preta, que possuem características diferentes, como tipo de germinação, família botânica e tamanho de semente.



## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **A importância da semente no sistema de produção**

As sementes são a principal ferramenta de propagação das culturas destinadas à alimentação humana e animal (HENNING, 2005). O comprometimento do custo de produção e, por conseqüência, da rentabilidade do cultivo, em função do gasto com a semente, é dependente da região do país, do tipo de sistema de produção e do grau de tecnologia utilizada. Para agricultores familiares que usam pouco ou nenhum insumo e que utilizam tração animal, o custo da semente tem um peso maior no custo total de produção.

O uso de sementes de boa qualidade é determinante para o sucesso da semeadura, estando diretamente relacionadas à produtividade e à lucratividade obtidas (SALUM et al., 2008). As sementes podem ser apontadas, inclusive, como promotoras do sucesso de áreas novas e extensas, com alta tecnologia e aprimoramento técnico, por ser o fator mais limitante nessas condições (BARROS, 2001).

As sementes são eficientes veículos de disseminação da maioria dos patógenos, e através delas, as doenças podem ser transportadas para pequenas e grandes distâncias, sendo introduzidas em novas áreas (NEERGAARD, 1979). Para sementes de soja, o ataque de patógenos pode ser considerado como uma das causas que levam à perda da qualidade fisiológica das sementes, causando redução na germinação (MERTZ et al., 2009).

O grau de infecção das sementes pode ser influenciado por vários fatores, entre os quais se destaca o tempo de permanência das sementes no campo, como demonstrado para soja, por Braccini et al. (2000) que, com o aumento de permanência no campo, após o estágio de maturação R8, aumentou a proporção de sementes infectadas por fungos e bactérias internos ao tegumento e, também, que cultivares diferentes, sob as mesmas condições, diferem em níveis de infecção.

A utilização de sementes com qualidade elevada é primordial, pois permite a obtenção de um estande adequado (TRENTINI et al., 2005; PEREIRA et al., 2007) e

a expressão do potencial genético da cultura, com uniformidade no campo e melhor desempenho (SÁ, 1999). A baixa qualidade fisiológica de sementes pode resultar em reduções na velocidade e emergência total, desuniformidade de emergência, menor tamanho inicial de plântulas, produção de matéria seca e na área foliar (KHAH et al., 1989; HÖFS et al., 2004; KOLCHINSKI et al., 2006).

### **Microbiolização de sementes**

Em atendimento a um mercado consumidor cada vez mais exigente e que busca alimentos livres de agrotóxicos, os alimentos chamados “orgânicos” tem ganhado destaque no sistema produtivo. O sistema de produção orgânica de alimentos preconiza a não utilização de produtos químicos, inclusive no tratamento das sementes, existindo portanto, a demanda do desenvolvimento de tratamentos de sementes que não utilizem tais produtos. Essa demanda recente e crescente alia-se a eficiência variável demonstrada por alguns produtos químicos no tratamento de sementes (GOULART, 1998).

O uso massivo de produtos químicos para controle de doenças causa, entre outros malefícios, intoxicações e contaminações, seleção de linhagens resistentes, desequilíbrio na população microbiana do sistema, reduzindo a biodiversidade e eliminado organismos benéficos responsáveis pela ciclagem de nutrientes (BETTIOL; MORANDI, 2009). Alguns patógenos não são passíveis de controle químico, como aqueles que colonizam o solo e atacam a semente e plântulas jovens em pré e pós-emergência, reforçando a necessidade de formas alternativas de controle.

Microbiolização é a aplicação de microrganismos vivos às sementes para o controle de doenças e/ou para promover o crescimento de plantas (MELO, 1996), promovendo benefícios na germinação de sementes, emergência e desenvolvimento das plântulas e produção de grãos e frutos (HARMAN, 2000).

### ***Trichoderma* spp.**

*Trichoderma* spp. destaca-se como bioprotetor por atuar como antagonista de alguns fitopatógenos de importância econômica e, também, por promover o crescimento e o florescimento de plantas (BAKER, 1989). Sua ação é conhecida desde a década de 1930 (WEINDLING, 1932 apud LOUZADA et al., 2009), sendo que os primeiros relatos no Brasil datam da década de 1950, quando foi descrita a inativação de vírus do mosaico do fumo (TMV) por filtrados de cultura de *Trichoderma* sp. (FORSTER, 1950). Segundo Monte (2001), 90% das aplicações de microrganismos antagonistas na agricultura são com isolados de espécies de *Trichoderma*.

A ação antagonista desse fungo ocorre em função de hiperparasitismo, pela competição por espaço, nutrientes e oxigênio (MARTINS-CORDER; MELO, 1998; CHET et al., 1997; CHET; INBAR, 1994) e antibiose. Entre as substâncias produzidas estão enzimas e antibióticos, que ao atuarem combinadas resultam em um maior grau de antagonismo (MCINTYRE et al., 2004; HOWELL, 2003). O bioprotetor inicia o controle antes de entrar em contato direto com os patógenos, através da liberação extracelular de exoquitinases que catalisa a liberação de oligômeros da parede celular do fungo a ser predado, induzindo a expressão de endoquitinases fungitóxicas (SIMKOVIC, et al., 2008, BRUNNER et al., 2003). Após o contato, *Trichoderma* spp. produz apressórios que, sob ação de diferentes enzimas e antibióticos, penetram na parede celular do alvo (CHET et al., 1998; SCHIRMBÖCK et al., 1994) e absorvem o resultado da dissolução da parede e do conteúdo celular. Trata-se de uma interação complexa, da qual se conhecem cerca de 20-30 genes, proteínas e outros metabólitos envolvidos (HARMAN et al., 2004).

A ação de *Trichoderma* spp. no controle de doenças é amplamente conhecida na literatura, no controle de *Meloidogyne javanica* (SHARON et al., 2001), *Pythium* spp. (NASEBY et al., 2000; THRANE et al., 2000), *Rhizoctonia* spp. (CÚNDOM et al., 2003), *Phytophthora* spp. (ETEBARIAN et al., 2000; EZZIYYANI et al., 2007), *Botrytis* spp. (LISBOA et al., 2007), *Crinipellis pernicioso* (SANOGO et al., 2002), entre outros.

Em trabalho realizado por Lohmann et al. (2007), isolados de *Trichoderma* spp. reduziram em, aproximadamente, 73% a ocorrência de tombamento, causado por *Sclerotium rolfsii*, em plântulas de soja, em comparação à testemunha.

Além dos benefícios sobre o controle de patógenos, *Trichoderma* spp. atua nos mecanismos envolvidos no crescimento de plantas através de fatores estimulantes de crescimento (OKON; KAPULNIK, 1986; BECKER; COOK, 1988; FALLIK et al., 1989), e mecanismos de defesa da planta (HARMAN et al., 2004), na solubilização de micronutrientes insolúveis no solo (ALTOMARE et al., 1989), proporciona maior absorção e translocação de minerais pouco disponíveis (BAKER, 1989), produz metabólitos e compostos específicos como estimulantes de crescimento, enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos e permeazes de carbono e nitrogênio (BENITÉZ et al., 2004). Destaca-se pelo rápido crescimento ao ser inoculado no solo e resistência a compostos tóxicos como herbicidas, fungicidas, inseticidas e compostos fenólicos (CHET et al., 1997).

A aplicação de *Trichoderma harzianum* em microestacas do porta enxerto GiSeLa6 (*Prunus canescens* X *Prunus cerasus*) promoveu maior crescimento e desenvolvimento das plântulas, expresso por maior comprimento da parte aérea, aumento do número de folhas, raízes, e diâmetro do caule bem como uma maior suberização no sistema radicular, o que pode constituir uma vantagem no momento de aclimação das plântulas (SOFO et al., 2010; 2012).

Em solos pobres, com baixos níveis de fertilidade, a adição de espécies de *Trichoderma* pode representar um aporte significativo na nutrição das plantas, devido a sua capacidade de solubilização de fosfatos (KAPRI; TEWARI, 2010), micronutrientes, ferro, manganês e magnésio (HARMAN et al., 2004). Quanto mais baixos os níveis de tais nutrientes mais significativo será o aumento de produtividade (BENITÉZ et al., 2004).

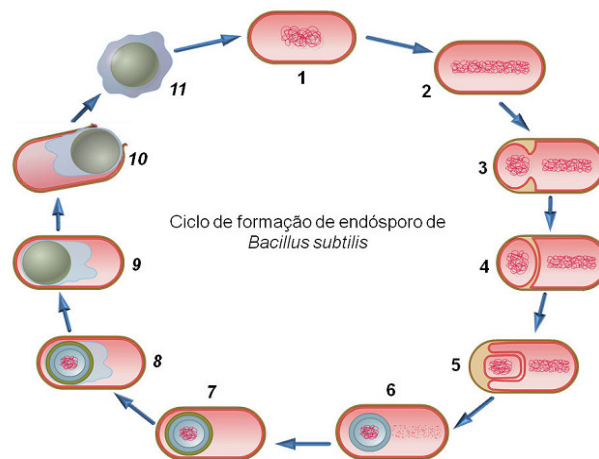
*Trichoderma* spp. promoveu incentivo da germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas de feijão e maior índice de velocidade de germinação em sementes de soja (MENEZES, 1992), maior germinação, emergência e vigor de plântulas de berinjela (MARTIN-CORDER; MELO, 1997), melhoria na germinação, emergência e vigor em algodão (FARIA et al., 2003). Resende et al. (2004) verificaram maior acúmulo de matéria seca nas raízes de milho provenientes de sementes inoculadas com este microrganismo.



## ***Bacillus subtilis***

Dentre os gêneros mais estudados de rizobactérias promotoras de crescimento, destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e rizóbios (ARAÚJO, 2008).

Uma vantagem na utilização de *Bacillus subtilis* está na sua capacidade de formação de endosporos. Nos momentos de escassez de nutrientes, as células norteadas por informações sensoriais, iniciam a formação de endósporo (Figura 1) (LANNA FILHO et al., 2010), paralisando o ciclo de crescimento e divisão celular. O endósporo tem características de extrema resistência a agressões externas, podendo permanecer intacto por milhões de anos (CANO; BORUCKI, 1995). Sendo, portanto, muito importante para a sobrevivência das populações de *B. subtilis* (STRAGIER; LOSICK, 1996; HENRIQUES et al., 2000), se estas são expostas a condições ambientais adversas. Esta capacidade viabiliza a veiculação de *B. subtilis* em bioformulados comerciais.



**Figura 1** – Representação esquemática da formação de endósporo em uma célula da bactéria *B. subtilis* sob condições nutricionais limitantes.

1) Célula em condições normais; 2) Condensação e alinhamento do DNA no centro da célula; 3) Invaginação celular e início da divisão do DNA em dois componentes; 4) Separação do DNA em dois componentes e formação do pré-endósporo; 5) Crescimento da porção maior da célula que engolfa o pré-endósporo; 6) Envolvimento do pré-endósporo por duas camadas de membrana e degradação do DNA; 7) Formação externa de um revestimento protéico e maturação do endósporo; 8) Formação de uma camada adicional denominada de exospórica; 9) Endósporo maduro, resistente às condições ambientais; 10) Destruição da célula bacteriana por enzimas líticas e liberação do endósporo e 11) Endósporo maduro. (LANNA FILHO et al., 2010).

Sua ação no biocontrole de fitomoléstias pode ser direta ou indireta (RYU et al., 2004; ONGENA et al., 2007; LEELASUPHAKUL et al., 2008). O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos ocorre através de antibiose, síntese de substâncias antimicrobianas, parasitismo, competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008). Chen et al. (2008) encontraram 14 compostos voláteis de *B. subtilis*, identificados através da cromatografia gasosa de espectro de massa (CG-MS), como aparente fonte de compostos bioativos.

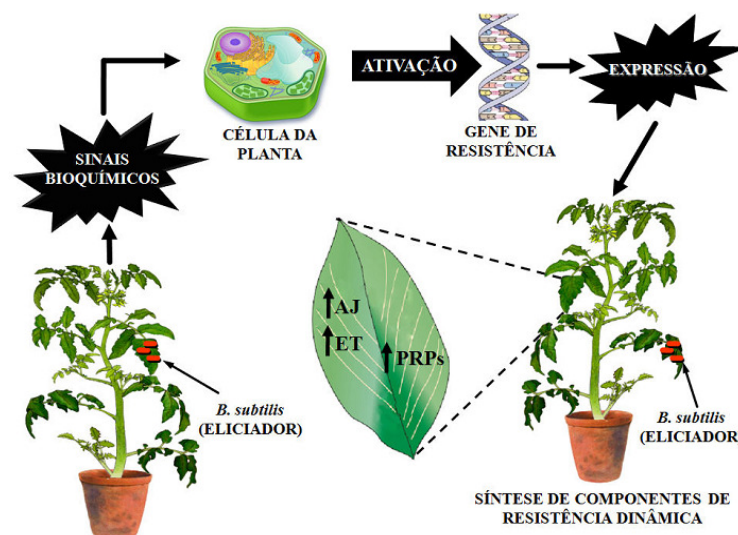
Segundo Lanna Filho et al., (2010), isolados de *B. subtilis* produzem uma grande variedade de metabólitos antifúngicos, entre os quais se encontram lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina. Embora estruturalmente semelhantes, estes lipopeptídeos diferem em alguns aspectos biológicos em relação à sua atividade. Como exemplo, iturinas e fengicinas exibem uma forte atividade antifúngica e são inibitórios para o crescimento de uma ampla gama de fitopatógenos. As surfactinas isoladas não são fungitóxicas, mas exercem efeito sinérgico antifúngico, quando em companhia da iturina A (MAGET-DANA et al., 1992). Em se tratando de fitobactérias, as surfactinas apresentam baixas propriedades antibacterianas, em contrapartida iturinas podem exercer papel inibitório sob bactérias Gram-positivas (LANNA FILHO et al., 2010). Também se atribui à síntese de surfactina a atividade antagônica e a capacidade de formar biofilme em torno das raízes.

Bais et al. (2004), utilizando um isolado mutante de *B. subtilis*, com deleção no gene surfactina sintase, portanto inábil em produzir surfactina, foi ineficaz no controle de *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis* e também ineficiente na formação de biofilme na superfície das raízes.

O mecanismo de antagonismo indireto é exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR) (Figura 2) (LANNA FILHO et al., 2010). Alguns microorganismos atuam na indução de resistência em plantas através de mecanismos bioquímicos pós-formados (PIETERSE; VAN LOON, 2004; CHOUDHARY et al., 2007). A resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR), são reguladas pela proteína NPR1, onde se cruzam na rota de sinalização (Figura 3) (PIETERSE; VAN LOON, 2004; CHOUDHARY et al., 2007). No entanto, as rotas de sinalização são distintas, pois SAR é governada pela

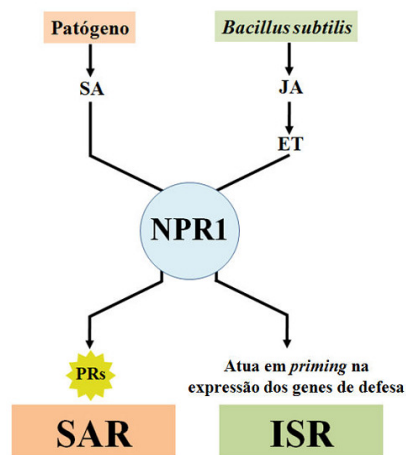
rota do ácido salicílico (AS) e ISR pela rota do ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (LANNA FILHO et al., 2010).

*B. subtilis* pode atuar na indução de resistência sistêmica adquirida de maneira direta ou através de substâncias produzidas, proporcionando uma resposta sistêmica ao ataque de patógenos (LANNA FILHO et al., 2010). Ongena et al. (2007) estudaram a síntese de lipopeptídeos por isolados de *B. subtilis*, que atuaram na indução de resistência em plantas de feijão e tomate. Ryu et al. (2004) observaram ação de compostos voláteis sintetizados por um isolado de *B. subtilis*, contra o patógeno *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* em plantas de *Arabidopsis*.



**Figura 2** – Diagrama esquemático do fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR), ocasionada pelo agente de biocontrole *B. subtilis*. Este ao entrar em contato com o tecido da planta incita a geração de sinais bioquímicos celulares, que estimulam o aumento da concentração de ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET). Em seguida, ocorre a transcrição de genes de defesa responsáveis pela expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (LANNA FILHO et al., 2010).

A ação antagonista de *B. subtilis* a patógenos está amplamente relatada na literatura. Kupper et al. (2003) destacam que a bactéria produziu desempenho semelhante ao fungicida benomyl no controle da queda prematura de frutos cítricos, causada por *Colletotrichum acutatum*.



**Figura 3** – Representação esquemática das rotas de sinalização desencadeada por patógenos e *B. subtilis* ou agentes de biocontrole. O patógeno atua desencadeando a biossíntese do ácido salicílico (AS), que irá promover a resistência sistêmica adquirida (SAR). Em contra partida, a bactéria inicia a biossíntese de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) que irá promover a resistência sistêmica induzida (ISR). Ambas as rotas de sinalização são governadas pela proteína NPR1. (LANNA FILHO et al., 2010).

*Bacillus subtilis* é uma rizobactéria à qual se atribui síntese de fito-hormônios, como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas e citocininas, que favorecem o crescimento das raízes e o aumento no número de pelos radiculares (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999), bem como promove aumento fisiológico de metabólitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular às condições externas, proporcionando a facilitação da percepção e absorção de nutrientes (MANJULA; PODILE, 2005). Adicionalmente, promove aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes e melhoria das condições do solo (LANNA FILHO et al., 2010). A inoculação simultânea de *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium* promoveu aumento na nodulação em feijão-caupi (ARAÚJO et al., 2010). Esse incremento pode ser devido ao aumento de competitividade da bactéria inoculada, ao aumento dos sítios de infecção e ao controle de fungos nas raízes (ARAÚJO e HUNGRIA, 1999). A coinoculação, também, promoveu aumento da matéria seca das raízes de feijão-caupi e de leucena (ARAÚJO et al., 1999). Plantas com suas necessidades nutricionais supridas apresentam maior capacidade de resistir a adversidades ambientais de diversas ordens.

Os benefícios produzidos por *B. subtilis* podem ser percebidos já em aplicações realizadas nas sementes. Manjula; Podile (2005) obtiveram maior rapidez de germinação em sementes de feijão guandu tratadas com formulação a base de *B. subtilis* AF1 em turfa suplementada com quitina, verificando que houve aumento da emergência e peso seco das mudas de 29 a 33%. A inoculação de sementes de milho com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras incrementou o crescimento, o desenvolvimento e a nutrição das plantas (ARAÚJO, 2008; ARAÚJO; GUERREIRO, 2010).

Muitos microrganismos com habilidade biocontroladora e promotora de crescimento têm sido estudados, bem como a técnica utilizada na sua incorporação junto às sementes (HARMAN, 2000). Faria et al. (2003) destacam a necessidade de testes com diferentes formulações de *Trichoderma* spp. Araújo (2008) também demonstra que a formulação tem um valor significativo para determinar a eficácia final do produto baseado em rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.

### **Condicionamento fisiológico**

O condicionamento fisiológico (restrição hídrica, condicionamento osmótico, hidrocondicionamento ou osmocondicionamento) foi desenvolvido por Heydecker et al. (1975) e vem sendo utilizado para melhorar o desempenho de sementes de cebola e cenoura (HÖLBIG et al., 2010; HÖLBIG et al., 2011) e também para inoculação de patógenos intensificando a infecção sem comprometer as características germinativas das sementes de algodoeiro e feijão (SOUSA et al., 2008; DEUNER et al., 2011).

Esta técnica é baseada no controle da velocidade de embebição de água pelas sementes, pelo uso de soluções osmóticas ajustadas a potenciais hídricos que permitam a ocorrência dos processos fisiológicos iniciais, sem atingir umidade suficiente para que ocorra o alongamento celular e, conseqüentemente, a protrusão da radícula (BONOME et al., 2006).

Os solutos utilizados durante o condicionamento não podem ser tóxicos ou causar alterações estruturais, penetrar no sistema de membranas das células, ser metabolizados e nem estarem sujeitos à deterioração microbiana durante o

condicionamento das sementes (BRADFORD, 1986). Para tal finalidade podem ser usados sais ( $K_3PO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $KNO_3$ ), açúcares (manitol, sorbitol), polietileno glicol (PEG) e glicerol.

Segundo Yoon et al. (1997), o condicionamento osmótico ou “priming” tem sido utilizado para melhorar o desempenho de sementes de espécies ornamentais e agrícolas, por acelerar o processo germinativo e uniformizar a germinação, além de auxiliar as sementes a superar estresses ambientais, como altas e baixas temperaturas, secas e alagamentos e solos salinos.

A utilização do PEG em sementes de pimentão resultou em melhoria na germinação e emergência (CHILEMBWE et al., 1992). Sementes de cebola condicionadas apresentaram melhor desempenho, principalmente nos testes de germinação e vigor, sob condições de laboratório, em relação às sementes não condicionadas e/ou embebidas em água destilada (LOPES et al., 1996). Entretanto, em sementes de citrus a porcentagem de emergência e germinação de sementes condicionadas foi menor do que a testemunha (CHILEMBWE et al., 1992).

Realizando condicionamento de sementes de *Peltophorum dubium*, Wanli et al. (2001) concluíram que o melhor desempenho foi exibido pelas sementes pré-condicionadas em água, a 10°C, e o pior com sementes pré-condicionadas em PEG (-1,0MPa), a 27°C. O condicionamento osmótico com  $KNO_3$  a 20 °C durante sete dias proporcionou, conforme KANG et al. (1997), aumento na taxa de germinação de sementes de pimentão, em comparação às sementes pré-condicionadas somente em água.

A resposta ao condicionamento pode ser variável conforme o agente condicionante utilizado, o potencial hídrico adotado, a espécie em estudo, até mesmo a diferenças entre os lotes de uma mesma espécie. As sementes de baixo vigor tendem a produzir respostas mais expressivas do que aquelas de maior vigor (HEYDECKER et al., 1975; LOPES et al., 1996). Brocklehurst e Dearman (1984) obtiveram os melhores resultados com condicionamento em PEG de sementes de alho-poró (*Allium porrum* L.) em lotes de baixo vigor. Entretanto, os danos nas sementes podem ser de tamanha extensão que são irreversíveis, não sendo possível efetuar, através do condicionamento, os processos de reparo celular eficientes (LANTERI et al., 2000)

Um entrave decorrente da utilização do condicionamento em sementes refere-se a secagem e posterior armazenamento das sementes condicionadas, o que

poderia anular o “priming” produzido ou predispor a semente à degradação. A secagem torna-se necessária para a maioria das espécies para utilização de semeadura mecanizada, que causaria danos mecânicos em sementes com elevado teor de água. Trabalhando com secagem em sementes condicionadas de melão, Nascimento e West (2000) observaram que a temperatura e a duração da secagem, prejudicaram a germinação e o vigor das sementes após determinado período de armazenamento.

A dificuldade em realizar inoculações eficientes, capazes de infectar e não apenas contaminar as sementes com fungos fitopatogênicos, estimulou pesquisadores a aprimorar suas técnicas, fazendo uso do condicionamento osmótico para aumentar o tempo de contato do fungo com a semente e mantê-la viável após isso (MACHADO et al., 2001a b; SOUSA et al., 2008). O uso de condicionadores em meio agarizado tem se mostrado eficiente para inoculação de patógenos, reduzindo a velocidade de germinação e aumentando o tempo de contato de fungos com a semente. Em meio BDA acrescido de Manitol, Machado et al. (2001b) constataram aumento do tempo de contato de sementes de milho com os patógenos *Diplodia maydis*, *Fusarium moniliforme* e *Cephalosporium acremonium*, elevando a infecção das plântulas produzidas. Resultados semelhantes foram observados por Pedroso et al. (2010) na inoculação de *Alternaria alternata* e *Alternaria dauci* em sementes de salsa. Da mesma forma, para sementes de soja, na inoculação de *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae* e *Sclerotinia sclerotiorum* (MACHADO 2001a). Em meio BSA (batata-sacarose-ágar), utilizando KCl como restritor, Costa (2003) obteve sucesso na inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijão.

Essa utilização aponta para a possibilidade de fazer uso da técnica para microbiolizar sementes com organismos benéficos. A associação do condicionamento fisiológico com a microbiolização pode promover sinergia dos benefícios de ambas às técnicas. Andreoli; Andrade (2003) verificaram que a integração do condicionamento matricial com um tratamento biológico (*Bacillus*) é efetiva em aumentar o vigor das sementes de milho de menor qualidade. A combinação do condicionamento com controle biológico em sementes, tem sido efetivo no controle de *Pythium ultimum* em milho doce (CALLAN et al., 1990; 1991). Andreoli; Khan (2000) utilizaram a combinação do condicionamento matricial com o

tratamento químico e biológico, para beneficiar o estande e a produtividade de várias culturas.

## **Películação**

A películação consiste em revestir as sementes com um “film-coating” (polímero), que possui, entre outros benefícios, excelente aderência às sementes, favorecendo a adição de insumos agrícolas (SILVEIRA, 1998), sem alterar o tamanho ou a forma, protegendo as sementes de ataque de patógenos (DINIZ et al., 2006). O uso de polímeros para recobrimento de sementes, ou películação, é uma técnica que foi adaptada a partir de materiais desenvolvidos para a indústria farmacêutica (TAYLOR et al., 2001).

São vários os benefícios desta técnica em tecnologia de sementes: melhorar as operações de semeadura, através pela redução do atrito entre as sementes (ROBANI, 1994), proporcionam uma cobertura durável, permeável à água, com possibilidade de aplicação em sementes de diferentes formas e tamanhos, mantendo as dimensões e formatos originais, garantir a eficiência dos tratamentos aplicados às sementes, melhorando a sua aderência, reduzindo os riscos de contaminação ao homem e meio ambiente, permitindo uma fácil diferenciação entre sementes tratadas ou não (NI; BIDDLE, 2001), proteger as sementes contra ataque de microrganismos patogênicos, regular o processo germinativo, e proporcionar máxima penetração e retenção dos produtos ativos (SILVEIRA, 1998),

O polímero utilizado pode diferir em função do objetivo a ser alcançado ao final da películação. Como exemplo o uso de películas hidrofílicas ou hidrofóbicas visando melhorar as relações hídricas das sementes com o solo (GIMENEZ-SAMPAIO; SAMPAIO, 1994). As películas hidrofílicas objetivam aumentar a disponibilidade de água no entorno da semente, acelerando a embebição e por consequência a germinação (BAXTER; WATERS-JUNIOR, 1987). Ou polímeros produzidos a partir de materiais com capacidade de alteração da permeabilidade à água, passando do estado cristalino e impermeável em água à baixa temperatura, para uma fase amorfa e tornando-se permeável em água, na presença de altas temperaturas (JOHNSON et al., 1999), usado em semeadura antecipada, para o



retardamento da germinação, ou em espécies suscetíveis ao frio (NI; BIDDLE, 2001).

A utilização consorciada de polímeros com produtos para tratamento das sementes visa aumentar a aderência, conferir maior segurança ao operador pela barreira adicionada entre o produto e o ambiente e sinalização das sementes tratadas. Bacon; Clayton (1986) observaram perdas de 30% de produto após transporte até o campo em sementes cujo tratamento não foi realizado em associação com a peliculização. Ao realizar o tratamento com um polímero, 100% do produto químico permanece aderido às sementes. Williams; Hopper (1997) apud Carvalho et al. (2010) demonstraram eficiência do polímero em conferir aderência e redução de perdas de produtos químicos em sementes de algodão tratadas, sendo que o seu efeito mais proeminente se o polímero foi misturado com o fungicida do que apenas aplicado após o tratamento químico.

Os efeitos da utilização de polímeros nos tratamentos de sementes vêm sendo relatados para diversas espécies. Ao avaliarem o desempenho de sementes de soja tratadas com diversos fungicidas, Pereira et al. (2009), observaram que a eficiência dos fungicidas testados no controle de patógenos ocorreu independentemente da peliculização. De mesmo modo, Pereira et al. (2007) concluíram que a qualidade fisiológica de sementes de soja não foi afetada pela associação de fungicidas com polímero. Em sementes de algodão, Lima et al. (2006) observaram que os filmes de revestimento não prejudicaram a qualidade fisiológica das sementes. Em sementes de feijão, Alves et al. (2003) e Clemente et al. (2003) verificaram que a peliculização associada ao fungicida não interferiu na qualidade fisiológica de sementes.

A peliculização de sementes vem se estabelecendo de forma gradativa no Brasil (TRENTINI et al., 2005; PEREIRA et al., 2007), no entanto, detalhes específicos das metodologias utilizadas para o recobrimento e fabricação dos polímeros, geralmente são segredos comerciais (BAUDET; PERES, 2004).

Existem poucos trabalhos que tratam da veiculação de microorganismos pela técnica da peliculização, em especial de *Trichoderma* spp. Segundo Diniz et al. (2006), a veiculação de *Trichoderma viride* pela técnica da peliculização promoveu aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência de plântulas de alface.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTOMARE, C. et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295- 22. **Applied Environmental Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 147-153, 1989.

ALVES, M. C. S. et al. Germinação e vigor de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) peliculizadas e tratadas com fungicida. **Informativo ABRATES**, v. 13, n. 3, p. 219, 2003.

ANDREOLI, C.; ANDRADE, R. V. DE. Efeito do matricondicionamento integrado com controle químico e biológico na emergência de plântulas e na produtividade de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 3, p. 132-142, 2003.

ANDREOLI, C.; KHAN, A.A. Integration of physiological, chemical and biological seed treatments to improve stand establishment and yield of vegetables. **Acta Horticulturae**, n. 533, p. 31 - 38, 2000.

ARAUJO, A. S. F. et al. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N<sub>2</sub> e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 182-185, 2010.

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.

ARAUJO, F. F.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.

ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n.9, p. 1633-1643, 1999.

BACON, J.R.; CLAYTON, P.B. Protection for seeds: a new film coating technique. **Span**, v.29, n.2, p.54-56, 1986.

BAIS, H.P.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v.134, p.307–319, 2004.

BAKER, R. Improved *Trichomonas* spp. for promoting crop productive. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 34-38, 1989.

BARROS, A.C.S.A. Produção de Sementes de Alta Qualidade. **Seed News**, Pelotas, Jul/Ago 2001.

BAUDET, L.; PERES, W. Recobrimento de sementes. **SEED News**, n.1, p.20-23, 2004.

BAXTER, L.; WATERS JUNIOR, L. Field and laboratory response of sweet corn and cowpea to a hydrophilic polymer seed coating. **Acta Horticulturae**, v.198, p.31-35, 1987.

BECKER, J. O.; COOK, R. J. Role of siderophores in suppression of *Pytium* species and production of increased growth response of wheat by fluorescent pseudomonas. **Phytopathology**, v. 59, n. 8, p. 1147-1151, 1988.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona-Spain, v.7, p.249-260, 2004.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. P.7-14.

BONOME, L.T.D.S. et al. Efeito do condicionamento osmótico em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Ciência e agrotecnologia**, v. 30, n.3, 2006.

BRACCINI, A. DE L. et al. Germinação e sanidade de sementes de soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) colhidas em diferentes épocas. **Acta Scientiarum**, n.22, v.4, p.1017-1022, 2000.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stres conditions. **HortScience**, v. 21, n. 5, p.1105-1112. 1986.

BROCKLEHURST, P. A; DEARMAN, J. A. A comparison of different chemical of osmotic treatment of vegetable seed. **Annals Applied Biology**, v. 105, n.2, 391-398p. 1984.

BRUNNER, K. et al. The NagI N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Current Genetics**, v.43, p.289-295, 2003.

CALLAN, N.W.; MATHRE, D.E.; MILLER, J.B. Biopriming seed treatment for biological control of *Phytophthora ultimum* preemergence damping-off in sh2 sweet corn. **Plant Disease**, v. 74, p. 368 - 372, 1990.

CALLAN, N.W.; MATHRE, D.E.; MILLER, J.B. Field performance of sweet corn seed bio-primed and coated with *Pseudomonas fluorescens* AB254. **HortScience**, v. 26, p. 1163 - 1165, 1991.

CANO, R.J.; BORUCKI, M.K. Revival and Identification of Bacterial Spores in 25- to 40-Million-Year-Old Dominican Amber. **Science**, v.268, p. 1060-1064, 1995.

CARVALHO, T.C. et al. Efeito de polímero no tratamento de sementes. **Revista Cultivando o Saber**, Cascavel, v.3, n.4, p.108-115, 2010.

CHEN, H. et al. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.919–923, 2008.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: KUBICEK, C.P.; HARMAN, G.E. (Org.) **Trichoderma and Gliocadium**. London-UK: Taylor and Francis, v.2, p. 153-171. 1998.

CHET, I.; INBAR, J.; Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, p. 37-43, 1994.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D.T.; SÖDERSTRÖM, B.(Org.) **The Mycota IV: Environmental and microbial relationships**. Berlin-Germany: Springer-Verlag, 1997. p.165-184.

CHILEMBWE, E. H. H; CASTLE, W. S; CANTLIFFE, D. J. Grading, Hydrating and osmotically priming seed of 4 citrus rootstocks to increase germination rate and seedling uniformity. **Journal American Society for Horticultural Science**, v.117, n. 3, p. 368-372. 1992.

CHOUDHARY, D.K.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p.289-297, 2007.

CLEMENTE, F. M. V. T.; et al. Peliculização associada a doses de fungicida na qualidade fisiológica de sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Informativo ABRATES**, v.13, n. 3, p. 219, 2003.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de algodoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p. 1023-1030, 2003.

CÚNDOM, M.A.; MAZZA, S.M.; GUTIÉRREZ, S.A. Short communication. Selection os *Trichoderma* spp. Isolates Against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal os Agricultural Research**, v.1, n.4, p.79-81, 2003.

DEUNER, C.C. et al. Inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão por meio da técnica de condicionamento fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.09-20, 2011.

DINIZ, K. A. et al. 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.

ETEBARIAN, H.R.; SCOTT, E.S.; WICKS, T.J. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potencial biological control agent for *Phytophthora erythroseptica*. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p. 329-337, 2000.

EZZIYYANI, M. et al. Biological Control of *Phytophthora* Root Roto f Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. **Journal of Phytopathology**, v.155, n.6, p.342-349, 2007.

FALLIK, E. et al. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.21, n.2, p.147-153, 1989.

FARIA, A.Y.K. et al. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.121-127, 2003.

FORSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. **Bragantia**, v.10, n.5, p.139-148, 1950.

GIMENEZ-SAMPAIO, T.; SAMPAIO, N.V. Recobrimento de sementes. **Informativo ABRATES**, v.4, n.3, p.20-52, 1994.

GOULART, A.C.P. Tratamento de sementes com fungicidas. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste. **Algodão: informações técnicas**. Dourados: EMBRAPA-CPAO: Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1998. p.71-84.

HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-393, 2000.

HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 43-56, 2004.

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

HENRIQUES, A.O.; MORAN JUNIOR, C.P. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. **Methods**, v.20, p.95-110, 2000.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, I. J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Tecnology**, v.3, n. 3, p. 881-888p. 1975.

HÖFS, A. et al. Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta à qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.92-97, 2004.

HÖLBIG, L. S.; BAUDET, L.; VILLELA, F. A. Hidrocondicionamento de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 171-176, 2011.

HÖLBIG, L.S. et al. Recobrimento de sementes de cenoura osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 22-28, 2010.

HOWEL, C.R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species em the Biological Controlo f Plant Disease: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p. 4-10, 2003.

JOHNSON, G. A.; et al. Use of temperature-responsive polymer seed coating to control seed germination. **Acta Horticulturae**, v. 504, p.229-236, 1999.

KANG, N. J. et al. Changes of seed proteins ralated to low temperature germinability of primed seeds of peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, v.38, n.4, p.342-346, 1997.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal Microbiologi*, v. 41, n. 3, Oct. 2010.

KHAH, E. M.; ROBERTS, E. H.; ELLIS, R. H. Effects of seed ageing on growth and yield of spring wheat at different plant-population densities. **Field Crops Research**, v.20, p.175-190, 1989.

KOLCHINSKI, E. M.; SCHUCH, L. O. B. ; PESKE, S. T. . Crescimento inicial de soja em função do vigor de sementes. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, p. 163-166, 2006.

KUPER, K.C.; FERNANDES, N.G.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 251-257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LANTERI S. et al. Molecular markers for the priming of pepper seeds (*Capsicum annum* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 75, n..5, p. 607-611. 2000.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LIMA, L.B. et al. Peliculização e tratamento químico de sementes de algodoeiro. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 1091-1098, 2006.

LISBOA, B.B. et al. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v.37, n.5, p. 1255-1260, 2007.

LOHMANN, T.R. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.1665-1668, 2007.

LOPES, H. M. et al. Germinação e vigor de sementes de cebola (*Allium cepa* L.) influenciados pelo período de temperatura de condicionamento osmótico. **Revista brasileira de sementes**, v. 18, n. 2, p.173-179. 1996.

LOUZADA, G.A.S. et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p. 145-149, 2009.

MACHADO, J.C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de Manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.95-101, 2001a.

MACHADO, J.C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.88-94, 2001b.

MAGET-DANA, R. et al. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v.74, p.1047–1051, 1992.

MANJULA, K.; PODILE, A.R.. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MARTIN-CORDER, M.P.P.; MELO, I.S. de. Influência de *Trichoderma viride* e *T. koningii* na emergência de plântulas e no vigor de mudas de berinjela. **Revista Brasileira de Biologia**, v.57, n.1, p.39-45, 1997.

MARTINS-CORDER, M.P.P.; MELO, I.S. Antagonismo "in vitro" de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, v.55, n.1, p.1-7. 1998.

MCINTYRE M, NIELSEN J, ARNAU J, VAN DER BRINK H, HANSEN K, MADRID S (eds). **Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics**. Copenhagen, Denmark, 2004.

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

MENEZES, M. Avaliação de espécies de *Trichoderma* no tratamento de feijão e do solo, visando o controle de *Macrophomina phaseolina*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**, 25, 1992, Gramado, RS. Resumos... Brasília: SBS, 159p, 1992.



MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v.39, n.1, 2009.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, v.4, p.1-4, 2001.

NASCIMENTO, W. M.; WEST, S. H. Drying during muskmelon (*Cucumis melo* L.) seeds priming and its effects on seed germination and deterioration. **Seed Science and Technology**, v. 28, p. 211-215. 2000.

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A.; LYNCH, J.M. Effect os biocontrol strains os *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p. 161-169, 2000.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**, v. 1. Ed.McMillan. London: 1979. 839 p.

NI, B.R.; BIDDLE, A.J. Alleviation of seed imbibitional chilling injury using polymer film coating. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM-SEED TREATMENT CHALLENGES AND OPPORTUNITIES, 2001. **Proceeding...** British Crop Protection Council, v.13, p.73-80, 2001.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. **Plant Soil**, v.90, p.3-16, 1986.

ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

PEDROSO, D. C. et al. Métodos de inoculação de *Alternaria alternata* e *A. dauci* em sementes de salsa e sua influência na qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**. v.32, n.3, p. 79-85, 2010.

PEREIRA, C.E. et al. Tratamento fungicida via peliculização e inoculação de *Bradyrhizobium* em sementes de soja. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n.3, p.433-440, 2009.

PEREIRA, C.E.; et al. Desempenho de sementes de soja tratadas com fungicidas e peliculizadas durante o armazenamento. **Revista Ciência e agrotecnologia**, v.31, n.3, p. 656-665, 2007.

PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.456-464, 2004.

RESENDE, M.L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p.793-798, 2004.

ROBANI, H. Film-coating of horticultural seed. **HortTechnology**, v.4, p.104-105, 1994.

RYU, C.M. et al. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SÁ, M. E. Condutividade elétrica em sementes de tomate (*Lycopersicon lycopersicon* L.). **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 201-204, 1999.

SALUM, J.D. et al. Características químicas e fisiológicas de sementes de feijão em função do teor de fósforo na semente e doses de fósforo no solo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.1, 2008.

SANOGO, S. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasita of *Crinipelis perniciosus* on cacao. **Phytopathology**, v.92, n.10, p.1032-1037, 2002.

SCHIRMBÖCK, M. et al. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 4364-4370, 1994.

SHARON, E. et al. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, v.91, n.7 p.687-693, 2001.

SILVEIRA, S. Recobertura como medida para proteção da semente. **SeedNews**, n.5, p.34-35, 1998.

SIMKOVIC, M. et al. Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. **Acta Chimica Slovaca**, v.1, n.1, p. 250 – 264, 2008.

SOFO, A. et al. Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6® (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*) rootstock. **Environmental and Experimental Botany**, v.76, p. 33–38, 2012.

SOFO, A.; MILELLA, L.; TATARANNI, G.; Effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on the growth of two *Prunus* rootstocks during the rooting phase. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.85, p.497–502. 2010.

SOUSA, M. V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.41-48 ,2008.

STRAGIER, P.; LOSICK, R.. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Annual Reviews of Genetics**, v.30, p.297-341, 1996.

TAYLOR, A.G. et al. Polymer film coating decrease water uptake and water vapour movement into seeds and reduce imbibitional chilling injury. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM – SEED TREATMENT CHALLENGES AND OPPORTUNITIES, 2001. **Proceedings...** British Crop Protection Council, p.215-220, 2001.

THRANE, C.; FUNK JENSEN, D.; TRONSMO, A. Substrate colonization, strains competition, enzyme production *in vitro*, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.215-220, 2000.

TRENTINI, P. et al. Peliculização: Desempenho de sementes de soja no estabelecimento da cultura em campo na região de Alto Garças, MT. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.84-92, 2005.

WANLI, Z. et al. Pré-condicionamento e seus efeitos em sementes de canafístula. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 23, n. 1, p.146-153, 2001.  
YOON, B.Y.; LANG, H.J.; COBB, B.G. Effects of priming on improve germination under stress. **Horticultural Science**, v.32, n.2, p.383-395, 1997.



## CAPÍTULO I

### DETERMINAÇÃO DO RESTRITOR E DO POTENCIAL HÍDRICO ADEQUADO PARA *Trichoderma* spp. E *Bacillus subtilis* EM MEIO DE CULTURA BDA.

#### RESUMO

*Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* são organismos de controle biológico e promoção de crescimento de plantas, sendo importante a veiculação via semente em associação com técnicas como o condicionamento fisiológico. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de restritores, utilizados para o condicionamento fisiológico de sementes, sobre o crescimento de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*. Os restritores KCl, NaCl, e manitol em diferentes potenciais (0,0, -0,6, -0,7, -0,8, -0,9 MPa), foram acrescidos ao meio de cultivo BDAe sobre os quais foram repicados um disco de 12 mm de meio BDA contendo micelio de *Trichoderma* spp. ou uma alíquota de 10 µL de suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*. Após 48 h foi realizada a avaliação do crescimento de *B. subtilis* e após 120 h foi mensurado o crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em quatro medidas diametralmente opostas a partir do disco repicado. Nenhum dos potenciais ou restritores utilizados impossibilitou o crescimento de *B. subtilis*. Todavia, para *Trichoderma* spp., NaCl em todos os potenciais testados limitou o crescimento, assim como os potenciais -0,7 e -0,9 MPa de KCl. Para manitol, apenas o potencial mais restritivo, -0,9 MPa, prejudicou o crescimento. Desse modo, determinou-se manitol como o melhor restritor para o crescimento de *B. subtilis* e *Trichoderma* spp.

**Palavras chave:** Microbiolização. Restrição hídrica. Condicionamento.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF THE POTENTIAL AND RESTRICTOR HYDRIC FOR *Trichoderma* spp. AND *Bacillus subtilis* IN CULTURE MEDIUM PDA.

*Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* are important organisms for biological control and plant growth promotion, it is important to serving via seed in combination with techniques such as physiological conditioning. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of adding restrictors used for conditioning seed physiology on growth of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis*. The restrictors KCl, NaCl, and mannitol were added to the culture medium PDA at different potentials (0.0, -0.6, -0.7, -0.8, -0.9 MPa) and which were transferred a disc of 12 mm PDA medium containing mycelium of *Trichoderma* spp. or a rate of 10 mL of bacterial cell suspension of *Bacillus subtilis*. After 48 h was performed to evaluate the growth or not *B. subtilis* was measured five days after the mycelial growth of *Trichoderma* spp. diametrically opposed in four steps from the disc peaked. None of the potential or restrictors used prevented the growth of *B. subtilis*, while for *Trichoderma* spp. NaCl at all potential tested, limited growth, as well as some potential of KCl. Mannitol only the potential for more restrictive, -0.9 MPa, impaired growth. Thus, it was determined as the best restrictor Mannitol for growth of *B. subtilis* and *Trichoderma* spp.

**Keywords:** Microbiolization. Water restriction. Conditioning.

## 1.1 Introdução

*Trichoderma*, fungo deuteromiceto pertencente à Ordem Hypocreales, é representado por fungos não fitopatogênicos, habitantes do solo, que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo e/ou antibiose (KRUGNER; BACCHI; 1995; MELO, 1998). Entre os biocontroladores que vêm sendo utilizados contra fitopatógenos do solo, isolados de *Trichoderma* têm-se destacado (REIS et al., 1995). É um fungo saprófita, que obtém sua nutrição de matéria orgânica em decomposição, não necessitando de um hospedeiro vivo para tal. Essa característica viabiliza a produção massal do fungo em materiais inertes para fabricação de biopreparados.

Outro organismo biocontrolador e promotor de crescimento com características que permitem a adaptação à produção massal é *Bacillus subtilis*. Em condições de escassez de nutrientes, as células iniciam a formação de endosporos (LANNA FILHO et al., 2010), extremamente resistentes a agressões externas (CANO et al., 1995). Sua ação no biocontrole de fitomoléstias pode ser direta, atuando sobre o patógeno alvo (LEELASUPHAKUL et al., 2008), ou indireta, através da resistência sistêmica induzida (LANNA FILHO et al., 2010). Aliado a isso, possui potencial de promoção de crescimento relatado para várias culturas (ARAÚJO et al., 2010; ARAÚJO; GUERREIRO, 2010).

Visando obter maior sucesso na inoculação de patógenos em sementes, intensificando a infecção sem comprometer as características germinativas das sementes, faz-se uso da adição de restritores hídricos ao meio de cultura (SOUSA et al., 2008; DEUNER et al., 2011). Desse modo, as sementes em contato com o meio absorvem água lentamente, e por conseqüência, levam maior tempo para germinar. O uso desta técnica na microbiolização de sementes tem objetivo similar, entretanto visa intensificar os benefícios dos organismos associados. A integração do condicionamento matricial com o tratamento biológico (*Bacillus*) foi efetiva em aumentar o vigor das sementes de milho (ANDREOLI; ANDRADE, 2003).

Devido a adaptação de ambos os organismos ao cultivo em meio de cultura agarizado, o objetivo deste trabalho foi determinar se a adição de restritores hídricos ao meio BDA (batata-dextrose-ágar) restringe o crescimento dos organismos.

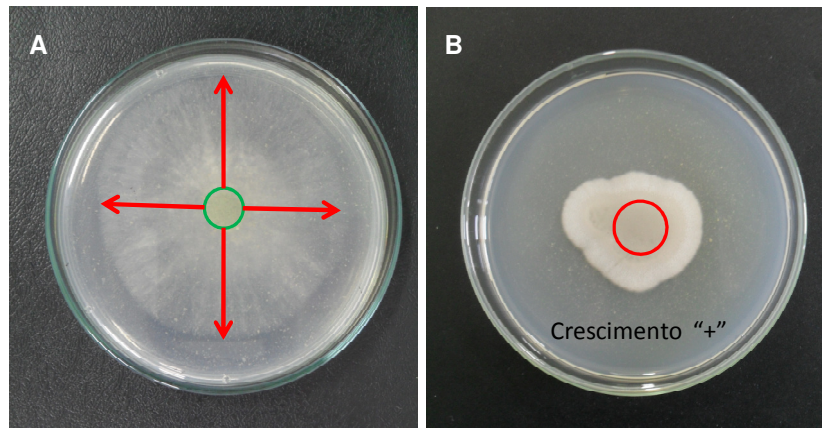
## 1.2 Material e métodos

Para a escolha do restritor, utilizou-se meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), acrescido dos solutos Manitol, NaCl e KCl, separadamente, e em diferentes potenciais hídricos: 0,0 -0,6, -0,7, -0,8 e -0,9 MPa (COUTINHO et al., 2001), que foram vertidos em placas de petri de 7 cm de diâmetro.

Para avaliação do crescimento de *Trichoderma* spp., o fungo foi isolado do produto comercial Agrotich<sup>®</sup> plus, repicado, com auxílio de uma alça de platina, e o produto transferido para placas contendo o meio de cultura BDA. Foram selecionadas aquelas placas que não apresentavam contaminações. Destas placas foram repicados discos de 12 mm de diâmetro contendo micélio do fungo para o centro das placas contendo os diferentes meios de cultura e diferentes potenciais. Para *B. subtilis*, foi repicado para o centro das placas 10 µL do produto comercial Rhizoliptus<sup>®</sup>. As placas foram incubadas em câmara de crescimento com fotofase de 12 h e temperatura de 25 °C por cinco dias.

Após 120 h foi determinado o crescimento das colônias de *Trichoderma* spp. a partir do disco de 12 mm, em quatro medidas diametralmente opostas (Figura 4 A). Para *B. subtilis* foi determinado o crescimento ou não da colônia (Figura 4 B) após 48h. Foram utilizadas quatro placas por tratamento, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. Posteriormente, foi realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM – Agri (CANTERI et al. 2001).





**Figura 4** – A: Avaliação do crescimento micelial de *Trichoderma* spp. com quatro medidas diametralmente opostas em meio de cultura com diferentes restritores e diferentes potenciais hídricos; B: Crescimento de colônia de *Bacillus subtilis* em meio de cultura com diferentes restritores e diferentes potenciais hídricos.

### 1.3 Resultados e discussão

Os diferentes potenciais e restritores não impediram o crescimento das colônias de *B. subtilis* demonstrando que a bactéria apresenta potencial para ser usada em microbiolizações associadas a condicionamento fisiológico em meio de cultura (Tabela 1). O crescimento micelial de *Trichoderma* spp. não foi influenciado pelo restritor Manitol nos potenciais -0,6, -0,7, -0,8 MPa, sendo que apenas o potencial mais restritivo, -0,9 MPa, limitou o crescimento do fungo. O restritor KCl, nos potenciais -0,6 e -0,8 MPa, também não foi limitante para o crescimento de *Trichoderma* spp. Os demais potenciais de KCl, e todos de NaCl, limitaram o desenvolvimento do fungo. Segundo Machado et al. (2004), a utilização de Manitol nos potenciais hídricos de -0,4, -0,6, -0,8, -1,0 MPa, não prejudicou o crescimento micelial dos fungos *Colletotrichum gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro.

**Tabela 1** – Crescimento de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* em meio de cultura BDA, sob diferentes restritores e potenciais.

Restritor	Potencial (MPa)	<i>Trichoderma</i> spp. (mm)	<i>Bacillus subtilis</i>
	0,0	31,9a	+
Manitol	-0,6	31,8a	+
	-0,7	32,9a	+
	-0,8	31,0a	+
	-0,9	28,4c	+
KCl	-0,6	32,1a	+
	-0,7	29,6b	+
	-0,8	31,3a	+
	-0,9	29,2b	+
NaCl	-0,6	29,7b	+
	-0,7	23,5d	+
	-0,8	27,6c	+
	-0,9	27,8c	+

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. \*\* Sinal positivo significa crescimento e negativo indica que não houve crescimento da colônia.

#### 1.4 Conclusões

- O restritor hídrico manitol, nos potenciais -0,6, -0,7, -0,8 MPa, não prejudica o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. em meio agarizado, podendo ser utilizado para a associação do condicionamento fisiológico com a microbiolização de sementes.

#### 1.5 Referências bibliográficas

ANDREOLI, C.; ANDRADE, R. V. DE. Efeito do matricionamento integrado com controle químico e biológico na emergência de plântulas e na produtividade de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 3, p. 132-142, 2003.

ARAUJO, A. S. F. et al. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, 2010.

ARAUJO, F. F.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.

CANO, R.J.; BORUCKI, M.K. Revival and Identification of Bacterial Spores in 25- to 40-Million-Year-Old Dominican Amber. **Science**, v.268, p. 1060-1064, 1995.

CANTERI, M. G., et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

COUTINHO, W. M. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

DEUNER, C.C. et al. Inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão por meio da técnica de condicionamento fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.09-20, 2011.

KRUGNER, T.L., BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 4, p. 46-95.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest. Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

MACHADO, J.C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.62-67 2004.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de.; AZEVEDO, J.L.de. **Controle biológico**. v. 1 Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. Cap. 1, 262p.

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, p. 16-20, 1995.

SOUSA, M. V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.41-48 ,2008.

## CAPÍTULO II

### TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO COM *Trichoderma* spp. E *Bacillus subtilis*

O objetivo deste trabalho foi potencializar o efeito da microbiolização de sementes de milho com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização. A microbiolização das sementes por suspensão foi realizada com os produtos comerciais Agrotich plus<sup>®</sup> e Rhizoliptus<sup>®</sup>. A restrição hídrica foi realizada em meio BDA + Manitol (- 0,7 MPa), para *Trichoderma* spp. ou para *Bacillus subtilis*. Em cada placa foram distribuídas 100 sementes de milho desinfestadas e ao ocorrer protrusão radicular na primeira semente, as demais foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h. A peliculização foi realizada com a adição do polímero Color Seed<sup>®</sup> (50 mL kg<sup>-1</sup>) à calda de tratamento contendo *Trichoderma* spp. ou ao produto Rhizoliptus. As sementes foram secas por 48 h em ambiente de laboratório. Foi utilizado um tratamento associando à peliculização e à restrição hídrica nas sementes microbiolizadas com os organismos individualmente e em associação. Sementes de milho tratadas com *Trichoderma* spp. apresentam menor incidência de patógenos associados e as plântulas originadas destas sementes e das microbiolizadas com *Bacillus subtilis* possuem maior crescimento e desenvolvimento. A microbiolização pela restrição hídrica causa alta mortalidade de sementes, prejudicando a germinação. O recobrimento das sementes microbiolizadas pela restrição hídrica com película reduz o efeito deletério. A microbiolização conjunta dos organismos pela técnica da restrição hídrica seguida pelo recobrimento com película produz plântulas de milho com maior número de folhas, maior altura e massa seca de parte aérea.

**Palavras-chave:** *Zea mays*. Polímero. Condicionamento. Germinação. Sanidade.

## ABSTRACT

### TECHNIQUES MICROBIOLIZATION OF CORN SEEDS WITH *Trichoderma* spp AND *Bacillus subtilis*

The objective of this study was the effect of leverage microbiolization corn seed with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* by physiological conditioning techniques, suspension of biological structures and film coating. The microbiolization seeds without suspension technique was carried out with commercial products Rhizoliptus<sup>®</sup> and Agrotrich plus<sup>®</sup>. Fluid restriction was held in PDA medium + mannitol (- 0.7 MPa) for *Trichoderma* spp. or *Bacillus subtilis*. In each plate were distributed 100 seed corn and disinfected when radicle protrusion occurred in the first seed, the others were removed and dried in a laboratory environment for 48 h. The film coating was performed with the addition of the polymer Color Seed<sup>®</sup> (50 mL kg<sup>-1</sup>) treatment of the syrup containing *Trichoderma* spp. or product Rhizoliptus. The seeds were dried for 48 h in a laboratory environment. We used a treatment associating film coating and fluid restriction in seed microbiolization with the bodies individually and in combination. Corn seeds treated with *Trichoderma* spp. a lower incidence of associated pathogens, seedling coming from these seeds and *Bacillus subtilis* microbiolization have higher growth and development. The microbiolization by water restriction causes high mortality of seeds, hindering germination. The coating film, seeds microbiolization by fluid restriction reduces the deleterious effect. The joint bodies microbiolization by the technique of water restriction followed by film coating produces maize seedlings with more leaves, greater height and shoot dry weight.

**Keywords:** *Zea mays*. Polymer. Conditioning. Germination. Sanity,

## 2.1 Introdução

As sementes podem atuar como disseminadoras de fungos, bactérias, vírus e nematóides, além de introduzir doenças em novas áreas e suas consequências epidemiológicas (NEERGAARD, 1979). Além da importância do uso de sementes saudáveis, também é necessário que esses propágulos tenham boa capacidade germinativa e produzam plântulas vigorosas, garantindo um adequado estabelecimento da população de plantas. Nesse sentido, a microbiolização com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* constitui-se em alternativa promissora na manutenção da qualidade, com redução da utilização de insumos químicos, que podem causar malefícios para o ambiente e/ou para organismos não alvos.

*Bacillus subtilis* é uma rizobactéria à qual se atribui síntese de fito-hormônios, como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas e citocininas, que favorecem o crescimento das raízes e o aumento no número de pelos radiculares (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999). A inoculação de sementes de milho com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras incrementou o crescimento, o desenvolvimento e a nutrição das plantas (ARAÚJO, 2008; ARAÚJO; GUERREIRO, 2010). Além disso, Araújo (2008) demonstrou que a formulação tem um valor significativo para determinar a eficácia final do produto baseado em rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.

Diversas espécies de *Trichoderma* spp. são relatadas com ação de controle sobre patógenos associados às sementes, controle de doenças no decorrer do ciclo em diferentes culturas, assim como ação na promoção de crescimento destas: *Trichoderma harzianum* aplicado em sementes de algodoeiro (FARIA et al. 2003), *Trichoderma* spp. em sementes de milho (LUZ, 2001), *Trichoderma hamatum* aplicado em substrato de cultivo de *Theobroma cacao* (BAE 2009), *Trichoderma harzianum* aplicado no substrato de cultivo de plântulas de tomate (MWANGI et al. 2011). No entanto, os efeitos da microbiolização de sementes relatados na literatura, são variáveis, podendo estar associados às diferentes metodologias utilizadas na microbiolização.

O condicionamento fisiológico (restrição hídrica, condicionamento osmótico, hidrocondicionamento ou osmocondicionamento) vem sendo utilizado para melhorar o desempenho de sementes de cebola e cenoura (HÖLBIG et al., 2010; HÖLBIG et

al., 2011) e também para inoculação de patógenos intensificando a infecção sem comprometer as características germinativas das sementes (SOUSA et al., 2008; DEUNER et al., 2011). A associação do condicionamento osmótico com a microbiolização pode promover sinergia dos benefícios de ambas às técnicas.

Também visando melhorar o desempenho e agregar valor às sementes faz-se uso de técnicas de beneficiamento, como o revestimento com películas. A peliculização proporciona, entre outros benefícios, revestimento das sementes com excelente aderência, favorecendo a adição de insumos agrícolas (SILVA et al. 2002), sem alterar o tamanho ou a forma e, protegendo as sementes de ataque de patógenos (DINIZ et al., 2006).

A cultura do milho é altamente responsiva à adubação, portanto técnicas de condicionamento que permitam rápido desenvolvimento das plântulas e sua independência das reservas das sementes tornam-se ainda mais importantes. OLIVEIRA et al. (2007) destacam que o condicionamento osmótico promoveu melhoria na germinação e no índice de velocidade de germinação em sementes de milho doce.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo potencializar o efeito da microbiolização de sementes de milho com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização.

## 2.2 Material e métodos

Foram utilizadas sementes de milho da variedade de polinização aberta “Sertanejo”, proveniente do banco de sementes da Associação dos Agricultores Guardiões de Semente de Milho Crioulo do município de Ibarama, RS. Nessas sementes, foram avaliados métodos de microbiolização (restrição hídrica, peliculização e suspensão de estruturas biológicas), para dois produtos biológicos comerciais, um à base de agente bacteriano (*Bacillus subtilis*) (Rhizoliptus<sup>®</sup>) e outro, a base de agente fúngico (*Trichoderma* spp) (Agrotrich<sup>®</sup>). Antes dos testes preliminares e da aplicação dos tratamentos, as sementes foram desinfestadas em



solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, seguido de álcool 70% por 1 minuto e, três banhos em água destilada e esterilizada.

### 2.2.1 – Determinação do potencial hídrico adequado para sementes de milho

Foi realizado um ensaio preliminar para determinar o potencial hídrico adequado para o condicionamento fisiológico de sementes de milho em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol. Para isso, o soluto manitol foi testado em diferentes potenciais hídricos (0,0 -0,6, -0,7, -0,8 e -0,9) sobre a germinação de sementes de milho. Em placas de petri, foi vertido meio de cultura com os diferentes potenciais (0,0; -0,6; -0,7; -0,8 e -0,9 MPa) (COUTINHO et al., 2001), sobre os quais foram colocadas 100 sementes de milho previamente desinfestadas. As sementes permaneceram incubadas em câmara de crescimento, com fotofase de 12 h e temperatura de 25 °C, até que houvesse protrusão radicular na primeira semente (Figura 5).

Em seguida, todas as sementes foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h, sendo a seguir instalado o teste de germinação em rolo de papel. Para cada potencial testado foram utilizadas 200 sementes, separadas em oito repetições de 25. Os rolos contendo as sementes foram mantidos em germinador, com fotofase de 12 h e temperatura de 25 °C, por quatro dias, quando foi realizada a primeira contagem de germinação e, aos sete dias de incubação foram determinados os percentuais de germinação, plântulas anormais e sementes mortas. Foi realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro, calculado o coeficiente de variação, e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).



**Figura 5** - Protrusão radicular em sementes de milho (*Zea mays*) condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto Manitol.

### 2.2.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos

Foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotofase de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos quatro e sete dias, e obteve-se o percentual de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### 2.2.3 – Aplicação dos tratamentos

Aplicação de suspensão de estruturas biológicas sobre as sementes: a suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. foi obtida a partir de 10 g de Agrotrich<sup>®</sup> plus colocados em 100 mL de água destilada e esterilizada, sendo aplicado 1 mL da suspensão para cada 100 sementes. Para *Bacillus subtilis* foi aplicado 1 mL do produto comercial para cada 100 sementes. Após a microbiolização, as sementes foram colocadas para secar, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

Condicionamento fisiológico: foi realizado em meio de cultura BDA acrescido do soluto Manitol -0,7MPa, sobre o qual foram repicados os organismos. *Trichoderma* spp. foi isolado do produto comercial Agrotrich<sup>®</sup> e as placas foram

incubadas por 10 dias para que o fungo esporulasse abundantemente. A repicagem de *Bacillus subtilis* foi realizada com a aplicação de 1 mL do produto comercial Rhizoliptus® sobre cada placa, e estas foram incubadas por 48 h para o crescimento e desenvolvimento da bactéria sobre o meio. Na microbiolização conjunta dos dois organismos foi aplicado, sobre as sementes, 1 mL do produto a base de *Bacillus subtilis* e estas foram acondicionadas sobre placas contendo *Trichoderma* spp.

Em cada placa, com os diferentes organismos, foram distribuídas 100 sementes de milho, sendo incubadas em germinador, com fotofase de 12 h e temperatura de 25°C, até que uma semente apresentasse o início de protrusão radicular, o que ocorreu 72h após a incubação. As demais sementes foram removidas do meio e colocadas a secar, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

Películação: foi utilizado o polímero Collor Seed® He Vermelho, o qual foi aplicado conforme recomendação do fabricante, 50 mL do produto para cada 100 kg de sementes. Para cada 100 sementes, foi preparada uma calda de tratamento adicionando a quantidade de polímero, referente ao peso da amostra, em 1 mL de suspensão de *Trichoderma* spp. ou do produto Rhizoliptus®. Em seguida as sementes foram secas sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

Sementes sem tratamento: as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, seguido de álcool 70% por 1 minuto e, três banhos em água destilada e esterilizada. Logo após, as sementes foram postas a secar em ambiente de laboratório por 48 h.

Tratamento químico: Foi utilizado o fungicida Captan SC (120 i.a.g/100 kg sementes) diluído em 1 mL de calda de tratamento de 100 sementes.

Foram utilizados nove tratamentos de microbiolização: T1: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp.; T2: Películação + *Trichoderma* spp.; T3: *Trichoderma* spp. por suspensão; T4: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp. seguido de películação; T5: Condicionamento fisiológico + *Bacillus subtilis*; T6: Películação + *Bacillus subtilis*; T7: *Bacillus subtilis* por suspensão; T8: Condicionamento fisiológico + *Bacillus subtilis* seguido de películação; T9: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* seguido de películação. T10: Tratamento químico (testemunha positiva), e T11: Sementes sem tratamento (testemunha negativa).

#### 2.2.4 – Avaliação dos tratamentos

Para avaliação do desempenho das sementes submetidas aos diferentes tratamentos, foram realizadas avaliações de sanidade, germinação, índice de velocidade de emergência, do crescimento e desenvolvimento de plântulas em casa de vegetação e desempenho a campo.

Para a avaliação da sanidade, foram utilizadas 200 sementes por tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes. Estas sementes foram colocadas em caixas "gerbox", previamente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, contendo duas folhas de papel filtro esterilizado, umedecidas com o herbicida 2,4-D a 0,5% para inibir a germinação. Após este procedimento, as sementes foram incubadas a 25 °C, com fotofase de 12 h, durante cinco dias e analisadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, para a observação das estruturas morfológicas dos fungos, os quais foram identificados em nível de gênero com o auxílio de bibliografia especializada (BARNET; HUNTER, 1972), determinando-se o percentual de incidência de cada gênero fúngico.

Para o teste de germinação, foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotofase de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos quatro e sete dias conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), sendo avaliadas na primeira contagem as plântulas normais de cada repetição.

Do teste de germinação foram separadas, aleatoriamente, dez plântulas e medido o comprimento de parte aérea e de raiz. Devido ao volume reduzido, as plântulas foram agrupadas em quatro repetições de 20 plântulas para a determinação de massa seca em estufa a 60 °C por 48 h. Aos sete dias de incubação, as plântulas foram classificadas em normais fortes, normais fracas, anormais e sementes mortas, e obteve-se o percentual de germinação em cada tratamento de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

No teste de frio foram utilizadas 200 sementes por tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. As sementes

permaneceram em refrigerador a 10 °C durante cinco dias e posteriormente, foram incubadas em germinador nas condições do teste de germinação, conforme MOLINA et al. (1987).

Para a avaliação do desempenho em casa de vegetação foram semeadas quatro repetições de 10 sementes, para cada tratamento, em canteiro, e irrigadas sempre que necessário. Foram realizadas contagens diárias das plântulas emergidas no canteiro até obter-se número constante e assim, determinou-se o índice de velocidade de emergência. Para cada repetição, foi calculado o índice de velocidade de emergência, somando-se o número de plantas emergidas a cada dia, dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da semeadura, conforme Maguire (1962). Aos 10 dias foi contabilizado o número de plantas emergidas, o número de folhas com tamanho superior a 5 cm, diâmetro do colo, estatura média da parte aérea e massa seca média da parte aérea de cada planta.

A avaliação do desempenho em campo foi realizada no município de Tapera-RS, (28° 43' 27,10" S; 52° 53' 45,54" O) com as principais características minerais descritas na tabela 2, e a análise completa encontra-se no anexo 1. A semeadura foi realizada em covas, com três sementes por cova e 12 covas por repetição. Foi utilizado o espaçamento de 0,5 m entre linhas e 0,4 m entre plantas totalizando a população de 50000 plantas ha<sup>-1</sup>. Para cada repetição foi semeada uma bordadura, com sementes sem tratamento, mantendo o mesmo espaçamento. A adubação foi realizada conforme as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004). O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições. Aos 20 dias após a semeadura (DAS) foi contabilizado o número de plântulas emergidas e medido o comprimento destas plântulas, após foi realizado um desbaste, deixando apenas uma planta por cova. No início do pendoamento foi medido, com auxílio de um paquímetro digital, o diâmetro do colo das plantas. Ao final do ciclo da cultura foi realizada colheita e debulha manual das espigas e determinada a produtividade por ha com ajuste de umidade para 13 %.

Para todas as variáveis avaliadas foi calculada a média e realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro, e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).

**Tabela 2** – Teores de argila, matéria orgânica (MO), pH em água, saturação por bases (V), fósforo extraído pelo método Mehlich-1 (P) e potássio (K), e suas interpretações.

Diagnóstico da fertilidade do solo						
Argila (%)	MO (%)	pH em água	V (%)	Saturação por alumínio (CTC efetiva)	K	P
48	2,3	5,8	72	7,8	56	10,1
Textura 2	baixo	médio	médio	baixo	médio	alto

Fonte: Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004).

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 – Determinação do potencial hídrico adequado para sementes de milho

Os efeitos dos potenciais hídricos -0,6, -0,7, -0,8, -0,9 MPa de manitol foram todos semelhantes entre si e superiores à testemunha (0,0 MPa) para primeira contagem de germinação e percentual de plântulas normais e apresentaram menor número de plântulas anormais (Tabela 3). Entretanto, o menor número de sementes mortas ocorreu no potencial -0,7 MPa, apesar de não ter diferido dos potenciais hídricos superiores e da testemunha. Devido ao incremento de desempenho proporcionado pelos potenciais hídricos em relação à testemunha (apenas BDA) e ao menor número de sementes mortas, determinou-se o potencial -0,7 MPa como o adequado para proceder o condicionamento osmótico de sementes de milho.

**Tabela 3** – Médias (%) de plântulas normais aos quatro dias (PN 4d), plântulas normais aos sete dias (PN 7d), sementes mortas (SMO) e plântulas anormais (PAN) de sementes de milho condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol em diferentes potenciais hídricos.

Tratamentos (MPa)	PN 4d	PN 7d	SMO	PAN
0,0	10 b*	52 b	12 a	27 a
- 0,6	19 a	72 a	13 a	11 b
- 0,7	18 a	78 a	5 a	11 b
- 0,8	19 a	78 a	8 a	9 b
- 0,9	18 a	76 a	8 a	10 b
CV (%)	22	18	66	73

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

### 2.3.2 – Determinação da germinação antes da aplicação dos tratamentos

A germinação inicial das sementes foi de 81%, sendo 62% primeira contagem de germinação.

### 2.3.3 – Avaliação dos tratamentos

A microbiolização com *Trichoderma* spp. foi mais eficiente ao se utilizar a restrição hídrica como método isolado ou associado à peliculização, atingindo 100% de sementes colonizadas. Todavia, a peliculização isolada foi semelhante à microbiolização com suspensão (Tabela 4). A microbiolização com *Trichoderma* spp. apenas não foi eficiente para o controle de *Fusarium* sp. ao utilizar apenas a peliculização. Em todos os tratamentos que havia a combinação de restrição hídrica e *Trichoderma* spp. houve o controle de *Penicillium* sp., sendo que o uso da peliculização isolada não foi eficiente e a suspensão favoreceu a incidência deste

patógeno. Luz (2001) observou ação sobre controle de patógenos associados às sementes de milho, tanto por espécies de *Trichoderma* spp. como por *B. subtilis*.

*Bacillus subtilis* não foi efetivo no controle dos patógenos associados às sementes de milho e em alguns tratamentos, houve incremento da incidência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. (Tabela 4). A associação de *B. subtilis* com *Trichoderma* spp. não modificou o efeito biocontrolador do fungo, demonstrando a possibilidade de associação dos organismos. Entretanto, a restrição hídrica e a peliculização favoreceram a incidência de *Fusarium* spp e a combinação destas técnicas reduziu a incidência de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp., reduzindo a competição e elevando a incidência de *Penicillium* spp. Apesar de não ter havido efeito direto sobre o controle de fungos em sementes, a aplicação de *Bacillus subtilis* no solo pode proporcionar o controle de doenças na parte aérea no decorrer do ciclo da cultura, já que se destaca como indutor de resistência. Nesse sentido, Araujo e Menezes (2009) verificaram o controle de doenças de parte aérea em tomateiro, com eficiência semelhante ao fungicida químico. O tratamento químico apresentou comportamento variável no controle os patógenos associados, favorecendo a incidência de *Fusarium* spp., apesar do controle de *Penicillium* spp.

A microbiolização de sementes de milho e a técnica utilizada para esse procedimento influenciaram a germinação das sementes e o desempenho das plântulas (Figura 6; Tabela 5). A intensa colonização de *Trichoderma* spp. nas sementes de milho, obtida pela microbiolização através da restrição hídrica, prejudicou a germinação das sementes, ocasionando elevado número de sementes mortas. A técnica foi aplicada visando aumentar o contato da semente com os organismos, entretanto estes propiciaram a ação saprofítica de *Trichoderma* spp. sobre as sementes no teste de germinação. (Figura 6). Machado et al., (2004) verificaram que a inoculação de patógenos em sementes de algodão com potenciais acima de -0,6 MPa provocaram a morte das sementes, provavelmente como consequência do maior nível de potencial de inóculo determinado pelo maior tempo de exposição das sementes aos patógenos. Entretanto a associação da restrição hídrica com a peliculização reduziu os efeitos negativos, ocorridos sob condições extremamente favoráveis ao desenvolvimento do fungo, mantendo os benefícios da microbiolização com *Trichoderma* spp. para as plântulas sem comprometer a germinação. Outros pesquisadores verificaram que a peliculização não interferiu no efeito de tratamento químico aplicado e não afetou a qualidade fisiológica de



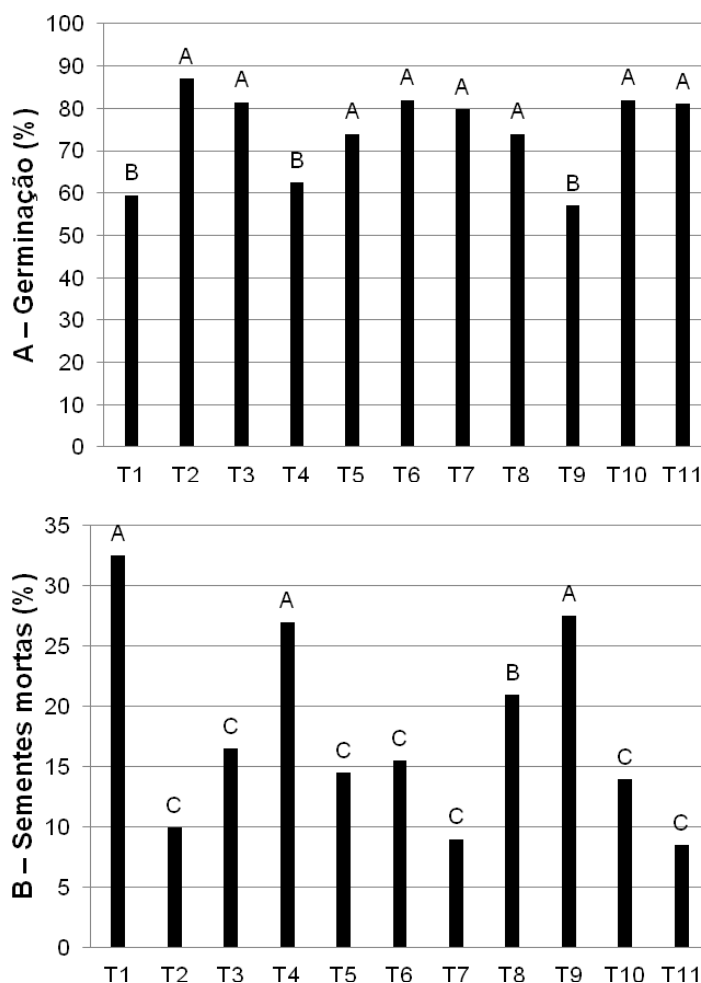
sementes de milho (PEREIRA et al., 2005). *Bacillus subtilis* não interferiu na germinação das sementes, entretanto, Mafia et al. (2009) observaram incentivo da germinação de sementes em *Eucalyptus* spp.

**Tabela 4** – Incidência (%) de *Trichoderma* spp. (TRI), *Fusarium* spp. (FUS), *Penicillium* spp. (PEN) em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos	TRI	FUS	PEN
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	100 a*	1 d	2 d
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização;	72 b	30 b	22 c
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	80 b	13 d	41 b
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	100 a	11 d	0 d
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	16 c	51 a	37 b
<i>B. subtilis</i> + peliculização	1 d	43 a	43 b
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	2 d	24 c	42 b
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	0 d	19 c	100 a
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	100 a	7 d	7 d
Tratamento químico	0 d	36 b	7 d
Sem tratamento	1 d	25 c	30 c
CV (%)	19	46	35

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Pesquisadores relatam casos em que espécies de *Trichoderma* causaram malefícios às culturas, como necrose em raízes de feijoeiro (CARVALHO et al., 2011), produção de metabólitos tóxicos a coleótilos de trigo por *T. viride* (CARVALHO et al., 2006) e ação herbicida de metabólitos de *T. harzianum*, *T. reesei* e *T. pseudokoningii* sobre *Avena fatua* (JAVAID; ALI., 2011).



**Figura 6** – Médias (%) de germinação (A) e de sementes mortas (B) de milho submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) germinação: 14,6; sementes mortas: 41,6. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A incorporação dos organismos com o uso da película favoreceu o vigor das plântulas, expresso pela primeira contagem de germinação (Tabela 5). A microbiolização com *Trichoderma* spp. com suspensão de esporos e de *B. subtilis* pelos métodos de suspensão e pela restrição hídrica, elevaram o percentual de plântulas fracas. A utilização do condicionamento fisiológico associado às microbiolizações também foi responsável por ocorrência de plântulas anormais em percentuais semelhantes às sementes sem tratamento, enquanto os demais

tratamentos reduziram esta ocorrência. Sob condições de stress por frio (teste de frio) observou-se que a microbiolização com *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* pelos métodos de suspensão e peliculização apresentam desempenho superior às sementes não tratadas, igualando-se ao tratamento químico (Tabela 5).

**Tabela 5** – Médias (%) primeira contagem de germinação (PCO), plântulas fortes (NFO), plântulas fracas (NFR), plântulas anormais (PAN), teste de frio (TFR) de sementes de milho submetidas à diferentes tratamentos.

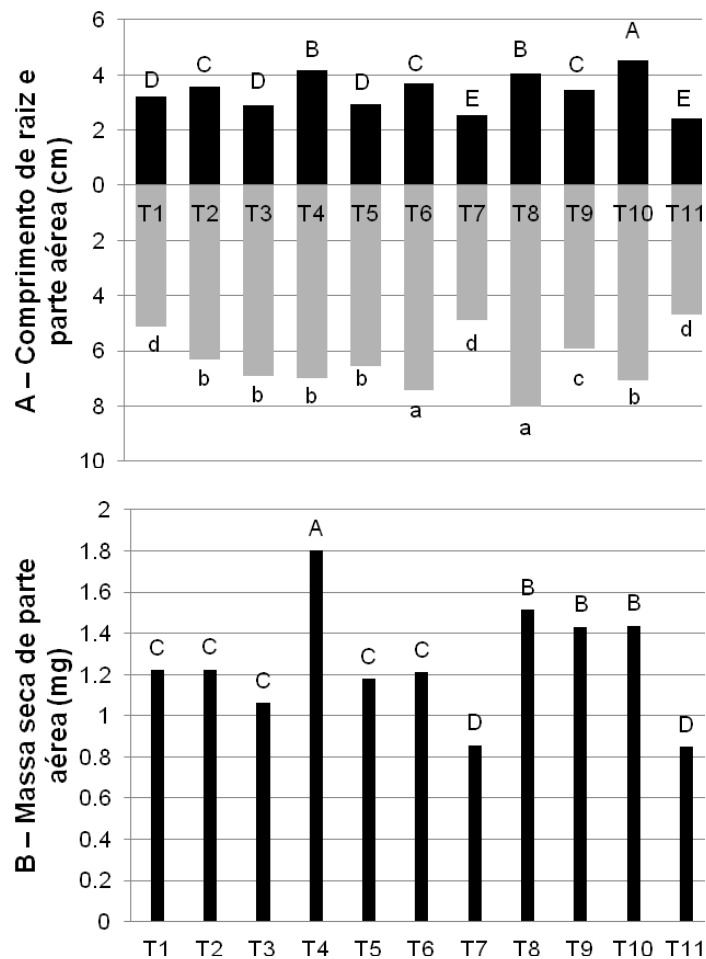
Tratamentos	PCO	NFO	NFR	PAN	TFR
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	48 c *	54 b	5 b	7 a	59 b
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	74 a	79 a	5 b	3 b	72 a
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	62 b	74 a	7 a	2 b	69 a
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	62 b	62 b	0 b	10 a	55 b
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	51 c	65 b	8 a	11 a	63 b
<i>B. subtilis</i> + peliculização	74 a	81 a	0 b	2 b	70 a
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	50 c	62 b	11 a	8 a	71 a
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	66 b	69 a	4 b	5 b	63 b
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	45 c	53 b	4 b	15 a	58 b
Tratamento químico	76 a	81 a	1 b	4 b	71 a
Sem tratamento	62 b	76 a	4 b	10 a	65 b
CV (%)	18	23	35	41	16

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Nas sementes não microbiolizadas, as plântulas apresentaram comprimento de parte aérea e radicular menores e menor acúmulo de massa seca de parte aérea (Figura 7), demonstrando os efeitos benéficos proporcionados pelos tratamentos às plântulas de milho, concordando com RESENDE et al. (2004), ao verificarem que sementes de milho inoculadas com *Trichoderma harzianum* originaram plantas com

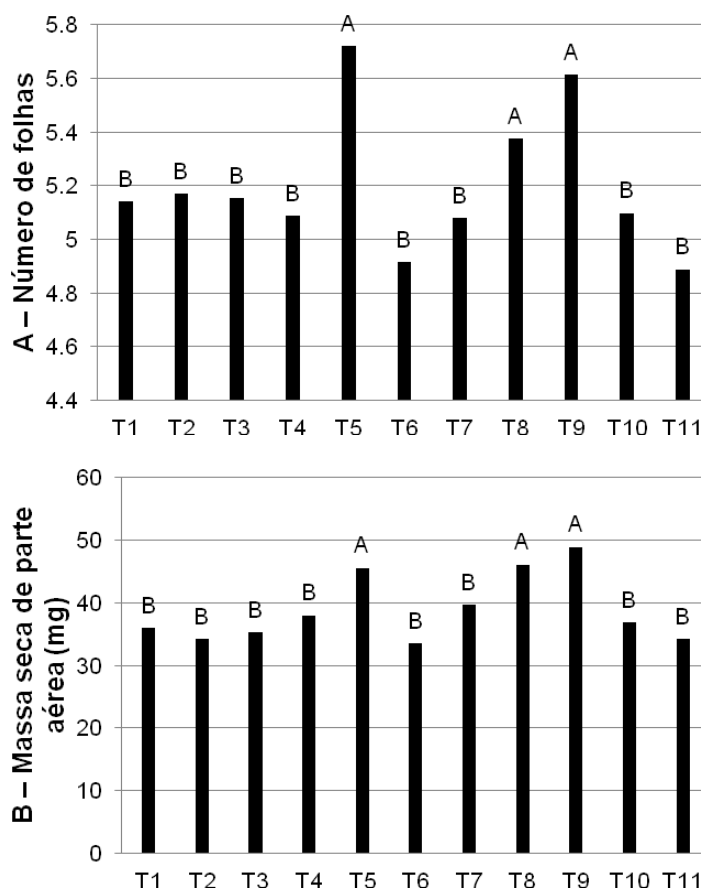
maior acúmulo de matéria seca nas raízes. Trabalhando com formulação de *Bacillus subtilis* com farinha de ostras, Araújo (2008) verificou maior crescimento e nutrição de plantas de milho. A combinação da restrição hídrica seguida da peliculização (T4 e T8) proporcionou crescimento de parte aérea superior às técnicas isoladas para os dois organismos. Observou-se que a utilização da peliculização, isolada ou associada à restrição hídrica, como forma de microbiolização com *B. subtilis*, proporciona incremento no crescimento das raízes. Outros pesquisadores também observaram efeito benéfico, de promoção de crescimento em plantas, produzido por *Bacillus subtilis*, como em *Eucalyptus* spp. (MAFIA et al., 2007; MAFIA et al., 2009). *Trichoderma* spp. apenas não favoreceu o crescimento radicular ao ser utilizada apenas a restrição hídrica. Entretanto o revestimento das sementes condicionadas, na presença de *Trichoderma* spp., proporcionou maior acúmulo de matéria seca de parte aérea. Trabalhando com sementes de alface microbiolizadas com *Trichoderma viride* pela técnica de peliculização, DINIZ et al. (2006) observaram aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência das plântulas.

Em casa de vegetação, sob condições favoráveis para o desenvolvimento das plântulas, a microbiolização com *B. subtilis* pelo condicionamento fisiológico, revestido ou não com película e associado ou não à *Trichoderma* spp., promoveu maior número de folhas e maior acúmulo de matéria seca de parte aérea (Figura 8). A associação bem sucedida dos dois organismos demonstra a possibilidade de sinergismo dos benefícios propiciados. Na avaliação do índice de velocidade de emergência, diâmetro do colo, altura e emergência nenhum dos tratamentos afetou as plântulas de milho, demonstrando que a redução da germinação ocorrida no teste de germinação não refletiu em menor emergência das plântulas no solo.



**Figura 7** – Comprimento (A) e massa seca (B) de parte aérea de plântulas de milho oriundas do teste de germinação, submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. C.V.% comprimento de parte aérea: 11,4; comprimento de raiz: 15,6; massa seca de parte aérea: 11,3. Médias com mesma letra maiúscula ou minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 8** – Número de folhas (A) e massa seca (B) de parte aérea de plântulas de milho cultivadas em canteiro submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) número de folhas: 7,0; massa seca de parte aérea: 21,0. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Vários fatores podem alterar o desempenho dos tratamentos aplicados às sementes, entre eles os fatores ambientais e a fertilidade natural do solo. No ensaio conduzido no campo, em que as sementes e posteriormente as plântulas ficaram expostas as adversidades ambientais, em solo com boa fertilidade natural, nenhum tratamento utilizado influenciou sobre a emergência e comprimento de plântulas, diâmetro do colo e produtividade de plantas de milho. Respostas significativas são esperadas em condições de baixa fertilidade natural. Bioprotetores não ofereceram proteção às sementes de soja, submetidas a períodos de estiagem no campo, (MERTZ et al., 2009). Trabalhando com inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em

sementes de algodoeiro, Sousa et al. (2008) observaram que ao mudar do substrato papel para solo e areia houve uma acentuada redução nos índices de doença, o que foi atribuído à alterações nas condições ideais de desenvolvimento do fungo, e por conseqüência, sua ação sobre o hospedeiro.

## 2.4 Conclusões

- *Trichoderma* spp. aplicado nas sementes de milho controla *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. associados.
- *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. promovem o crescimento e desenvolvimento de plântulas de milho.
- A microbiolização pode ser potencializada com o uso do condicionamento fisiológico e peliculização.
- A microbiolização pela restrição hídrica causa alta mortalidade de sementes, prejudicando a germinação no teste em rolo de papel. O recobrimento das sementes microbiolizadas pela restrição hídrica com película reduz o efeito deletério produzido.
- A microbiolização conjunta de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. pela técnica da restrição hídrica seguida pelo recobrimento com película produz plântulas de milho com maior número de folhas, maior altura e massa seca de parte aérea.

## 2.5 Referências bibliográficas

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.

ARAUJO, F. F.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.

ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n.9, p. 1633-1643, 1999.

ARAUJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

BAE, H., The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.11, p.3279–3295, 2009.

BARNET, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 398p.

CANTERI, M. G., et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CARVALHO, D.D.C. et al. Avaliação da capacidade de produzir fitotoxinas *in vitro* por parte de fungos com propriedades antagônicas a nematóides. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1230-1235. 2006.

CARVALHO, D.D.C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p. 28-34, 2011.

COUTINHO, W.M. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.127-135, 2001.

CQFS-RS/SC - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - SC/RS. **Manual de adubação e de calagem para Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 2004. 400p



DEUNER, C.C. et al. Inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão por meio da técnica de condicionamento fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.09-20, 2011.

DINIZ, K. A. et al. 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.

FARIA, A. Y. K. et al. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 1, 2003.

HÖLBIG, L.S.; BAUDET, L.; VILLELA, F.A. Hidrocondicionamento de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.171-176, 2011.

HÖLBIG, L.S. et al. Recobrimento de sementes de cenoura osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.22-28, 2010.

JAVOID, A.; ALI, S. Alternative management of a problematic weed of wheat *Avena fatua* by metabolites of *Trichoderma*. **Chilean Journal Of Agricultural Research**, n.71, v.2, 2011.

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

MACHADO, J.C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.62-67 2004.

MAFIA, R. G. et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, v. 31, n. 4, p. 589-597, 2007.

MAFIA, R. G. et al. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MERTZ, L.M. et al. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.13-18, 2009.

MOLINA, J.C.; IRIGON, D.L.; ZONTA, E.P. Comparação entre metodologias do teste de frio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.9, n.3, p.77-85, 1987.

MWANGI, M. W. et al . Inoculation of tomato seedlings with *Trichoderma harzianum* and Arbuscular Mycorrhizal Fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.2, 2011.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**, v. 1. Ed.McMillan. London: 1979. 839 p.

OLIVEIRA, A.S. et al. Condicionamento osmótico em sementes de milho doce submetidas ao armazenamento. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.4, p. 444-448, 2007.

PEREIRA, C.E.; OLIVEIRA, J.A.; EVANGELISTA, J.R.E. Qualidade fisiológica de sementes de milho tratadas associadas a polímeros durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.6, p.1201-1208, 2005.

RESENDE, M.L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p.793-798, 2004.

SILVA, J. B. C.; SANTOS, P. E. C.; NASCIMENTO, W. M. Desempenho de sementes peletizadas de alface em função do material cimentante e da temperatura de secagem dos péletes. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 67-70, 2002.

SOUSA, M.V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.41-48, 2008.

# CAPÍTULO III

## TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO COM *Trichoderma* spp. E *Bacillus subtilis*

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi potencializar o efeito da microbiolização de sementes de feijão com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização. A microbiolização pelo método de suspensão de estruturas biológicas foi realizada com os produtos comerciais Agrotrich plus<sup>®</sup> e Rhizoliptus<sup>®</sup>. A restrição hídrica foi realizada em meio BDA + Manitol (- 0,7 MPa), para *Trichoderma* spp. ou para *Bacillus subtilis*. Em cada placa foram distribuídas 50 sementes de feijão desinfestadas, ao ocorrer a protrusão radicular na primeira semente, as demais foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h. A peliculização foi realizada com a adição do polímero Color Seed<sup>®</sup> (150 mL kg<sup>-1</sup>) à calda de tratamento contendo *Trichoderma* spp. ou ao produto Rhizoliptus. As sementes foram secas por 48 h em ambiente de laboratório. Foi utilizado um tratamento recobrimo as sementes condicionadas com os organismos, ou a associação deles. A metodologia de microbiolização com o uso de suspensão de esporos ou de células bacterianas promove crescimento de plântulas de feijão, não necessitando outras técnicas para potencializar estes benefícios. O recobrimento de sementes condicionadas de feijão reduz a qualidade das sementes. *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* promovem crescimento de plântulas de feijão, estendendo seus benefícios mesmo quando a plântula se torna independente das reservas da semente.

**Palavras chave:** *Phaseolus vulgaris*. Polímero. Condicionamento. Germinação. Sanidade.

## ABSTRACT

### TECHNIQUES MICROBIOLIZATION OF BEAN SEEDS WITH *Trichoderma* spp AND *Bacillus subtilis*

This work was microbiolization potentiate the effect of bean seed with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* by physiological conditioning techniques, suspension of biological structures and film coating. The microbiolization the suspension method of biological structures was carried out with commercial products Rhizoliptus<sup>®</sup> and Agrotrich plus<sup>®</sup>. Fluid restriction was held in PDA medium + mannitol (- 0.7 MPa) for *Trichoderma* spp. or *Bacillus subtilis*. In each plate 50 seeds were sterilized bean, when radicle protrusion was the first seed, the others were removed and dried in a laboratory environment for 48 h. The film coating was performed with the addition of the polymer Color Seed<sup>®</sup> (150 mL kg<sup>-1</sup>) treatment of the syrup containing *Trichoderma* spp. or product *Rhizoliptus*. The seeds were dried for 48 h in a laboratory environment. We used a treatment covering the seeds primed with organisms, or their association. The methodology of using microbiolization suspension of spores or bacterial cells promotes growth of seedlings of beans, not requiring additional techniques to enhance these benefits. Seed coating reduces conditioned bean seed quality. *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* promote growth of bean seedlings, extending its benefits even when the seedling becomes independent of seed reserves.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. Polymer. Conditioning. Germination. Sanity.

### 3.1 Introdução

O tratamento de sementes é uma ferramenta importante para garantir a sanidade das sementes e das plântulas originadas, permitindo a expressão dos potenciais genético e fisiológico da cultura. A microbiolização é uma técnica que visa recobrir as sementes com organismos vivos que atuam como biocontroladores e/ou como promotores de crescimento (MELO, 1996). Dentre os gêneros mais estudados de rizobactérias promotoras de crescimento, destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e rizóbios (ARAÚJO, 2008). De mesmo modo, a microbiolização com *Trichoderma* spp. oferece resultados promissores na manutenção da qualidade, com redução da utilização de insumos químicos, que podem causar malefícios para o ambiente e/ou para organismos não alvos.

*Bacillus* sp. foi capaz de induzir a presença de isoperoxidases em plântulas de feijoeiro, atuando no biocontrole do crescimento bacteriano comum do feijoeiro, mostrando ser efetivo na indução de enzimas relacionadas às defesas das plantas tanto em aplicações via semente como em aplicações por aspersão em plantas (SBALCHEIRO et al., 2009). Ongena et al. (2007) estudaram a síntese de lipopeptídeos por isolados de *B. subtilis*, que atuaram na indução de resistência em plantas de feijão e tomate. Manjula; Podile (2005) observaram maior rapidez de germinação em sementes de feijão guandu tratadas com formulação a base de *B. subtilis* AF1 em turfa suplementada com quitina, verificando que houve um aumento da emergência e peso seco das mudas de 29 a 33%. Benefícios secundários podem ser observados na inoculação simultânea de *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium* promovendo aumento na nodulação em feijão-caupi (ARAÚJO et al., 2010).

*Trichoderma* spp. é um fungo que possui conhecido potencial no controle de patógenos (LISBOA et al., 2007, CÚNDOM et al., 2003, LOHMANN et al., 2007), promoção de crescimento de plantas (SOFO et al., 2010; 2012) além de promover melhoria na germinação, emergência e vigor em algodão (FARIA et al., 2003). Resende et al. (2004) verificaram maior acúmulo de matéria seca nas raízes de milho provenientes de sementes inoculadas com este microrganismo. *Trichoderma* spp favoreceu a germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas de feijão e maior índice de velocidade de germinação em sementes de soja (MENEZES, 1992).

O uso da restrição hídrica para inoculação de patógenos em sementes tem sido eficiente, pois aumenta o tempo de contato, intensificando a infecção sem comprometer as características germinativas das sementes (SOUSA et al., 2008; DEUNER et al., 2011). A associação do condicionamento osmótico com a microbiolização pode promover sinergia dos benefícios de ambas às técnicas.

O condicionamento osmótico com PEG 6000 isolado ou associado a aplicação de zinco aumentou a altura de inserção da primeira vagem, o número de vagens por planta e o número de sementes por vagem em plantas de feijoeiro (SPEROTTO et al., 1999). Entretanto, a realização de hidro-priming em sementes de feijão se mostrou ineficiente, pois as plântulas sem condicionamento produziram menor percentual de plântulas anormais (ABEBE; MODI, 2009).

A peliculização é uma ferramenta utilizada para agregar valor às sementes, conferindo maior aderência de insumos agrícolas (SILVEIRA, 1998), protegendo do ataque de patógenos (DINIZ et al., 2006), e melhorando a operação de semeadura (ROBANI, 1994). Em sementes de feijão, Alves et al. (2003) e Clemente et al. (2003) verificaram que a peliculização associada ao fungicida não interferiu na qualidade fisiológica de sementes. Utilizando a peliculização como forma de veiculação de *Trichoderma viride*, Diniz et al. (2006) constataram aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência de plântulas de alface.

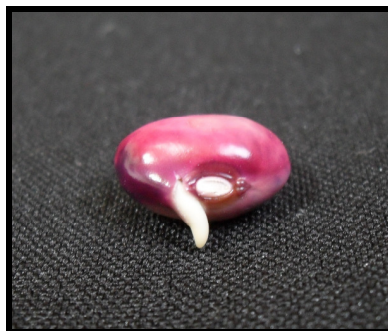
Assim, o objetivo deste trabalho foi potencializar o efeito da microbiolização de sementes de feijão com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização.

### **3.2 Material e métodos**

Foram utilizadas sementes de feijão de cinco variedades provenientes de Ibarama, RS, Brasil, preto lote 1 (L1), preto lote 2 (L2), carioca branco, carioca vermelho e guabiju vermelho. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, seguido de álcool 70% por 1 minuto e, três banhos em água destilada e esterilizada.

### 3.2.1 – Determinação do potencial hídrico adequado para sementes de feijão

O condicionamento fisiológico foi realizado em placas de petri contendo 50 mL do meio BDA, com adição de soluto manitol em diferentes potenciais hídricos (0,0 -0,6, -0,7, -0,8 e -0,9 MPa) (COUTINHO et al., 2001). Sobre as placas vertidas com o meio de cultura nos diferentes potenciais foram distribuídas 50 sementes de cada variedade. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento (12h de luz a 25°C) até que houvesse protrusão radicular na primeira semente (Figura 9). As demais foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h, para posteriormente ser instalado o teste de germinação em rolo. Para cada potencial testado foram utilizadas 200 sementes, separadas em oito repetições de 25. Os rolos do teste de germinação foram mantidos em germinador, com 12 h de luz e temperatura de 25 °C, por cinco dias, quando foi realizada a primeira contagem de germinação e, aos nove dias foram determinados os percentuais de plântulas normais e anormais e sementes mortas. Foi realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro, calculado o coeficiente de variação, e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).



**Figura 9** – Protrusão radicular em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol.

### 3.2.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos

Com base na viabilidade de condução do condicionamento fisiológico em meio de cultura, apenas as sementes da variedade guabiju vermelho foram submetidas ao teste de germinação em rolo. Foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotofase de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos cinco e nove dias e obteve-se o percentual de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### 3.2.3 – Aplicação dos tratamentos

Foram avaliados diferentes métodos de microbiolização (restrição hídrica, peliculização e suspensão de estruturas biológicas), para dois produtos biológicos comerciais, um à base de agente bacteriano (*Bacillus subtilis*) (Rhizoliptus®) e outro, a base de agente fúngico (*Trichoderma* spp.) (Agrotrich®).

Aplicação de suspensão de estruturas biológicas sobre as sementes: a suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. foi obtida a partir de 10 g de Agrotrich® plus colocados em 100 mL de água destilada e esterilizada, sendo aplicado 0,5 mL da suspensão para cada 50 sementes. Para *Bacillus subtilis* foi aplicado 0,5 mL do produto comercial Rhizoliptus® para cada 50 sementes. Após a microbiolização, as sementes foram colocadas para secar, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

Condicionamento fisiológico: realizado em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol a -0,7MPa, sobre o qual foram repicados os organismos. *Trichoderma* spp. foi isolado do produto comercial Agrotrich®, sendo as placas incubadas por 10 dias para que o fungo esporulasse abundantemente. A repicagem de *Bacillus subtilis* foi realizada com a aplicação de 0,5 mL do produto comercial Rhizoliptus® sobre



cada placa, incubadas por 48 h para o crescimento e desenvolvimento da bactéria sobre o meio. Na microbiolização conjunta dos dois organismos, foi aplicado sobre as sementes 0,5 mL do produto a base de *Bacillus subtilis* e estas foram acondicionadas sobre placas contendo *Trichoderma* spp. Em cada placa, com os diferentes organismos, foram distribuídas 50 sementes de feijão, sendo incubadas em germinador, com fotofase de 12 h e temperatura de 25°C, até que uma semente apresentasse o início de protrusão radicular, o que ocorreu 72h após a incubação. As demais sementes foram removidas do meio e colocadas a secar, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

Películação: foi utilizado o polímero Collor Seed<sup>®</sup> He Vermelho, o qual foi aplicado conforme recomendação do fabricante, 150 mL do produto para cada 100 kg de sementes. Para cada 50 sementes foi preparada uma calda de tratamento adicionando a quantidade de polímero, referente ao peso da amostra, em 0,5 mL de suspensão de *Trichoderma* spp. ou do produto Rhizoliptus<sup>®</sup>. Em seguida as sementes foram secas, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

Sementes sem tratamento: as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, seguido de álcool 70% por 1 minuto e, três banhos em água destilada e esterilizada. Logo após, as sementes foram postas a secar em ambiente de laboratório por 48 h.

Tratamento químico: foi utilizado o fungicida Captan SC (120 i.a.g/100 kg sementes) diluído em 0,5 mL de calda de tratamento de 50 sementes.

Foram utilizados nove tratamentos de microbiolização: T1: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp.; T2: Películação + *Trichoderma* spp.; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp. seguido de películação; T5: Condicionamento fisiológico + *Bacillus subtilis*; T6: Películação + *Bacillus subtilis*; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: Condicionamento fisiológico + *Bacillus subtilis* seguido de películação; T9: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* seguido de películação. T10: Tratamento químico (testemunha positiva); e T11: Sementes sem tratamento (testemunha negativa).

### 3.2.4 – Avaliação dos tratamentos

Para avaliação do desempenho das sementes submetidas aos diferentes tratamentos, foram realizadas avaliações de sanidade, germinação, índice de velocidade de emergência, do crescimento e desenvolvimento de plântulas em casa de vegetação e emergência em campo.

Para a mensuração da sanidade, foram utilizadas 200 sementes por tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes. Estas sementes foram colocadas em caixas "gerbox", previamente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, contendo duas folhas de papel filtro esterilizado, umedecidas com o herbicida 2,4-D a 0,5% para inibir a germinação. As sementes foram incubadas a 25 °C, com fotofase de 12 h, durante cinco dias e analisadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, para a observação das estruturas morfológicas dos fungos, os quais foram identificados em nível de gênero com o auxílio de bibliografia especializada (BARNET; HUNTER, 1972), determinando-se o percentual de incidência de cada gênero fúngico.

Para o teste de germinação, foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotofase de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos cinco e nove dias conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), sendo avaliadas na primeira contagem as plântulas normais de cada repetição, das quais foram separadas, aleatoriamente, dez plântulas e medido o comprimento de parte aérea e de raiz. Devido ao volume reduzido, as plântulas foram agrupadas em quatro repetições de 20 plântulas para a determinação de massa seca em estufa a 60 °C por 48 h. Aos nove dias de incubação, as plântulas foram classificadas em normais fortes, normais fracas e anormais e sementes mortas e obteve-se o percentual de germinação em cada tratamento de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

No teste de frio foram utilizadas 200 sementes por tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. As sementes

permaneceram em refrigerador a 10 °C durante cinco dias e posteriormente, foram incubadas em germinador nas condições do teste de germinação.

Foram conduzidos dois ensaios para avaliação das plântulas em casa de vegetação, um em canteiro e outro em copos plásticos, ambos irrigados diariamente e avaliados aos 10 dias após a sementeira, para os quais utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. Foram realizadas contagens diárias das plântulas emergidas no canteiro e nos copos até obter-se número constante e assim, determinou-se o índice de velocidade de emergência. Para cada repetição, foi calculado o índice de velocidade de emergência, somando-se o número de plantas emergidas a cada dia, dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da sementeira, conforme Maguire (1962).

Foram semeadas quatro repetições de 10 sementes, para cada tratamento, em canteiro de solo revolvido até 20 cm de profundidade. Foi contabilizado o número de plantas emergidas, a largura da primeira folha trifoliolada, diâmetro do colo, estatura média e massa seca média da parte aérea de cada planta. Também em casa de vegetação, foram semeadas quatro repetições de cinco plantas em copos plásticos de 500 mL de capacidade contendo 300 g de substrato comercial (Plantmax<sup>®</sup>). Foram realizadas avaliações de plântulas emergidas, largura da primeira folha trifoliolada, diâmetro do colo, comprimento do sistema radicular e da parte aérea e massa seca do sistema radicular e da parte aérea.

A avaliação do desempenho em campo foi realizada no município de Tapera-RS, (28° 43' 27,10" S; 52° 53' 45,54" O) em solo com as principais características minerais descritas na tabela 6, e a análise completa encontra-se no anexo 1. A sementeira foi realizada em delineamento blocos ao acaso com três repetições. Para cada bloco foram semeadas cinco linhas de cultivo espaçadas em 30 cm, sendo as três linhas centrais de sementes tratadas, e as duas externas de bordadura com sementes sem tratamento, entre as parcelas também foi utilizada bordadura de sementes sem tratamento. O espaçamento entre plantas foi de 15 cm, totalizando uma população de 200000 plantas por ha<sup>-1</sup>. A sementeira foi realizada em covas, com duas sementes por cova. A adubação foi realizada conforme as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004). Aos 20 dias após a sementeira foi realizada a avaliação do percentual de plântulas emergidas.

Para todas as variáveis avaliadas foi calculada a média e realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro, e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).

**Tabela 6** – Teores de argila, matéria orgânica (MO), pH em água, saturação por bases (V), fósforo extraído pelo método Mehlich-1 (P) e potássio (K), e suas interpretações.

Diagnóstico da fertilidade do solo						
Argila (%)	MO (%)	pH em água	V (%)	Saturação por alumínio (CTC efetiva)	K	P
48	2,3	5,8	72	7,8	56	10,1
Textura 2	baixo	médio	médio	baixo	médio	alto

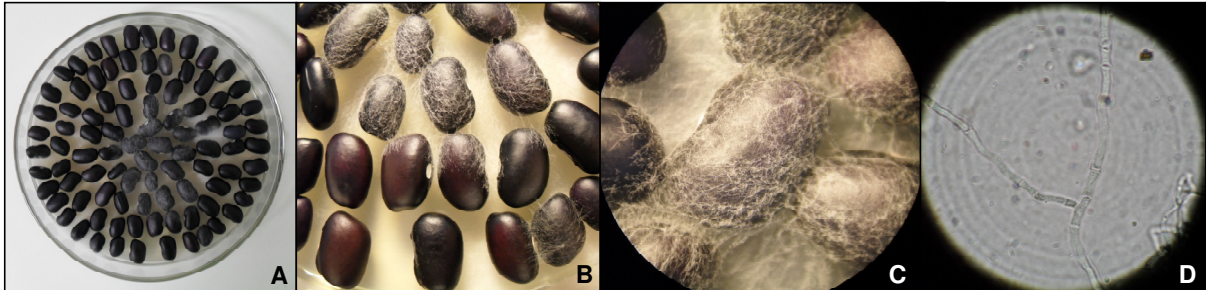
Fonte: CQFS-RS/SC (2004).

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 – Determinação do potencial hídrico adequado para sementes de feijão

Na determinação do potencial hídrico adequado em meio de cultura BDA foi observada infecção por *Rhizoctonia solani* (Figura 10) em quatro dos cinco lotes de feijão testados, sendo eles: feijão preto lote 1 (L1), preto lote 2 (L2), carioca branco e carioca vermelho. Ao se eliminar os fungos externos à semente pela assepsia, e colocá-las sobre o meio de cultura, aliado à liberação de solutos pela semente no início da embebição, o patógeno encontrou condições favoráveis para colonizar as sementes, causando alta mortalidade e inviabilizando o uso do condicionamento fisiológico. Apenas a variedade guabiju vermelho, que não apresentava infecção

pelo patógeno, pode ser utilizada para o condicionamento fisiológico em meio de cultura.



**Figura 10** – Infecção de *Rhizoctonia solani* em sementes de feijão preto Lote 1. A – Sementes em meio de cultura BDA com crescimento do patógeno. B, C – Vista em lupa do crescimento micelial sobre as sementes. D – Vista em microscópio do micélio característico de *Rhizoctonia solani*.

Os potenciais 0,0, -0,7, -0,8, -0,9 MPa de manitol foram todos semelhantes entre si e superiores ao potencial -0,6 MPa para primeira contagem de germinação e percentual de plântulas normais (Tabela 7). Entretanto o potencial -0,9 MPa causou elevação do percentual de sementes mortas e os potenciais 0,0, -0,6 e -0,8 MPa elevaram o percentual de plântulas anormais. Devido ao incremento de desempenho proporcionado pelo potencial -0,7 MPa em relação às sementes sem tratamento (apenas BDA) e aos demais potenciais, determinou-se o potencial -0,7 MPa em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol, como o adequado para proceder o condicionamento fisiológico de sementes de feijão. Queiroz et al. (2000) observaram a ocorrência de anormalidades em plântulas de feijão condicionadas, principalmente relacionadas ao sistema radicular, assim como o condicionamento osmótico, pelo uso do PEG6000, reduziu a germinação de plântulas de feijão em laboratório.

**Tabela 7** – Médias (%) de plântulas normais aos cinco dias (PN 5d), plântulas normais aos nove dias (PN 9d), sementes mortas (SMO) e plântulas anormais (PAN) de sementes de feijão condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol em diferentes potenciais hídricos.

Tratamentos (MPa)	PN 5d	PN 9d	SMO	PAN
0,0	59 a*	76 a	12 b	36 b
- 0,6	20 b	37 b	10 b	77 a
- 0,7	80 a	96 a	11 b	15 c
- 0,8	76 a	85 a	7 b	32 b
- 0,9	71 a	76 a	30 a	21 c
CV (%)	23	20	77	29

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

### 3.3.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos

A germinação inicial das sementes de feijão guabiju vermelho foi de 95%, sendo 89% a primeira contagem de germinação, o que pode influenciar o efeito dos tratamentos aplicados. Faria et al. (2003) atribuíram ao alto vigor apresentado por sementes de algodão, a resposta praticamente nula aos tratamentos químicos aplicados.

### 3.3.3 – Avaliação dos tratamentos

O uso do condicionamento fisiológico favoreceu a microbiolização com *Trichoderma* spp. sendo mais eficiente ao ser utilizada a combinação com *B. subtilis* (Tabela 8). O revestimento das sementes condicionadas não reduziu o incremento produzido, entretanto a peliculização isolada foi menos eficiente que a suspensão.

Na avaliação da sanidade (Tabela 8), o efeito da microbiolização variou conforme a técnica utilizada e conforme o patógeno em estudo. O condicionamento fisiológico isolado, para *B. subtilis* (T5) e *Trichoderma* spp. (T1), e seguido pelo recobrimento para *B. subtilis* (T8), elevou a incidência de *Fusarium* sp. A microbiolização com *Trichoderma* spp. por suspensão de esporos (T3) e com o uso da restrição hídrica isolada (T1) e a associação dos dois organismos e das duas técnicas (T9) reduziram a incidência de *Penicillium* sp.

**Tabela 8** – Incidência (%) de *Trichoderma* spp. (TRI), *Fusarium* spp. (FUS), *Penicillium* spp. (PEN) em sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos.

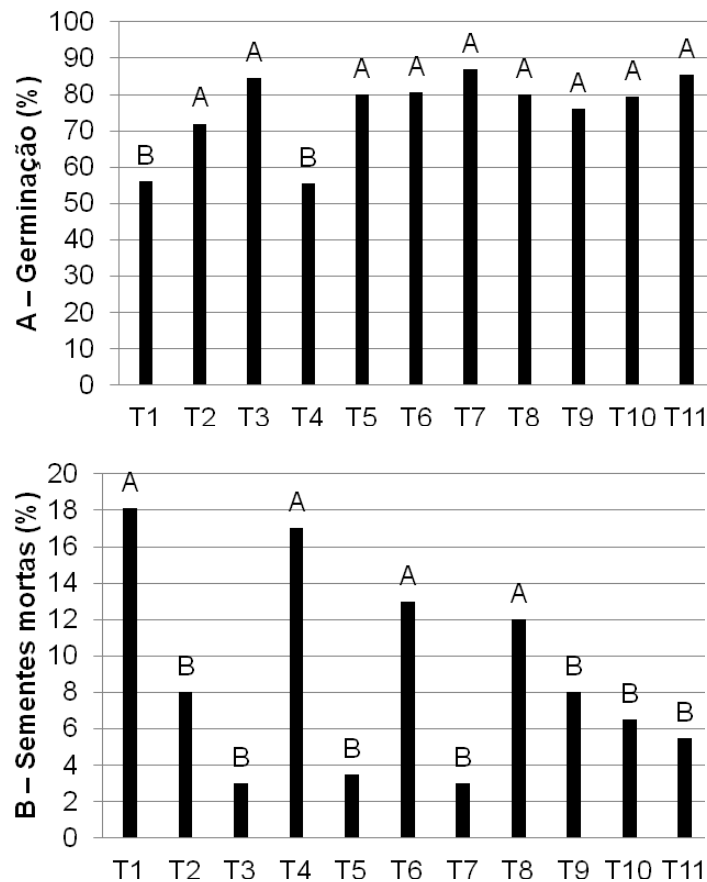
Tratamentos	TRI	FUS	PEN
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	88 b*	33 a	8 f
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	5 d	8 b	72 b
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	48 c	14 b	1 f
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	81 b	6 b	18 e
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	0 d	33 a	59 c
<i>B. subtilis</i> + peliculização	0 d	9 b	50 c
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	0 d	3 b	85 a
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	0 d	27 a	33 d
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	98 a	1 b	0 f
Tratamento químico	0 d	3 b	0 f
Sem tratamento	1 d	6 b	14 e
CV (%)	25	56	37

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Na avaliação da germinação em rolo de papel foi possível observar efeito deletério produzido pela microbiolização com *Trichoderma* spp. e pelo uso da restrição hídrica, com níveis não alcançando 60% de sementes germinadas (Figura 11). A restrição hídrica foi conduzida com temperatura e umidade favoráveis para a colonização de *Trichoderma* spp., que nessas condições utiliza a semente como fonte de nutrição, atuando como fungo saprofítico, causando morte de sementes. Sob condições diferentes das relatadas como favoráveis para o desenvolvimento o fungo, seja a veiculação pelo polímero (T2), pela suspensão de esporos (T3) ou a associação com outro organismo (T9), não houve interferência sobre a germinação. Utilizando suspensão de esporos como técnica de microbiolização do mesmo organismo, Carvalho et al. (2011) constataram que não houve prejuízo à germinação de sementes sadias de feijão. A microbiolização com *B. subtilis* pela peliculização, precedido ou não pelo condicionamento fisiológico também foi responsável por elevar a mortalidade de sementes de feijão, entretanto não houve prejuízo à germinação das sementes.

O uso do tratamento químico, assim como das técnicas de condicionamento e peliculização para a microbiolização com *Trichoderma* spp. prejudicaram o vigor das plântulas de feijão, expresso pela primeira contagem de germinação, sendo que apenas a suspensão de esporos não prejudicou a primeira contagem de germinação (Tabela 9). A associação de *Trichoderma* spp. com o condicionamento fisiológico acarretou redução na totalidade de plântulas fortes produzidas, assim como elevou o percentual de plântulas fracas. Não houve efeito significativo sobre o percentual de plântulas anormais. Todas as técnicas utilizadas para microbiolização com *B. subtilis* não comprometeram a primeira contagem de germinação e os percentuais de plântulas fortes e anormais, conferindo maior segurança na utilização da microbiolização com este organismo. Sob condições de estresse por frio, o recobrimento das sementes condicionadas na presença de *Trichoderma* spp. manteve a germinação acima de 80%, sendo o melhor desempenho, seguido pela microbiolização com *B. subtilis* com o uso da suspensão e peliculização, e o tratamento químico.





**Figura 11** – Percentual de germinação (A) e sementes mortas (B) no teste de germinação de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) germinação: 14,7; sementes mortas: 79,0. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

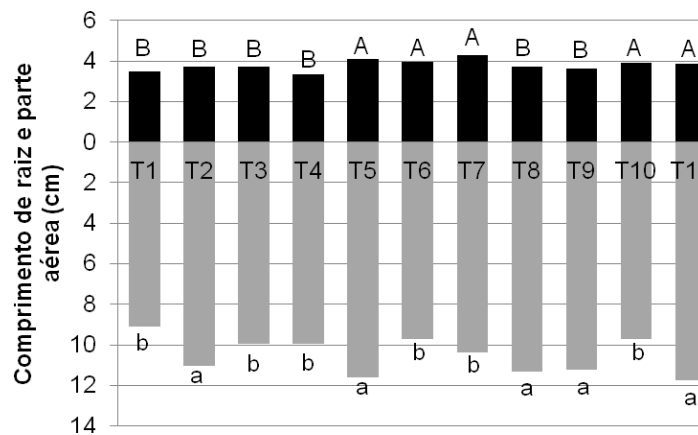
Independentemente da metodologia utilizada, *Trichoderma* spp. reduziu o comprimento de parte aérea de plântulas de feijão (Figura 12). Para *B. subtilis* apenas o revestimento das sementes condicionadas na presença do organismo teve o mesmo efeito deletério. Entretanto, sobre o crescimento do sistema radicular, a utilização de película e da combinação de técnicas e organismos como forma de veiculação de *Trichoderma* spp. não teve efeito negativo. Já para *B. subtilis*, o uso da película e da suspensão reduziram o crescimento do sistema radicular. De

mesma maneira, o tratamento químico prejudicou o crescimento das raízes das plântulas.

**Tabela 9** – Médias (%) da primeira contagem de germinação (PCO), plântulas fortes (PFO), plântulas fracas (PFR), teste de frio (TFR) de sementes de feijão submetidas à diferentes tratamentos

Tratamentos	PCO	PFO	PFR	TFR
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	54 c *	55 b	25 a	60 c
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	68 b	69 a	20 a	66 c
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	80 a	83 a	12 b	64 c
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	44 c	55 b	27 a	88 a
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	76 a	79 a	16 b	69 c
<i>B. subtilis</i> + peliculização	78 a	80 a	6 b	72 b
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	84 a	86 a	10 b	76 b
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	79 a	79 a	8 b	45 d
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	66 b	74 a	16 b	65 c
Tratamento químico	70 b	77 a	14 b	74 b
Sem tratamento	80 a	85 a	9 b	65 c
CV (%)	16	14	60	18

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 12** – Comprimento de plântulas do teste de germinação de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos.

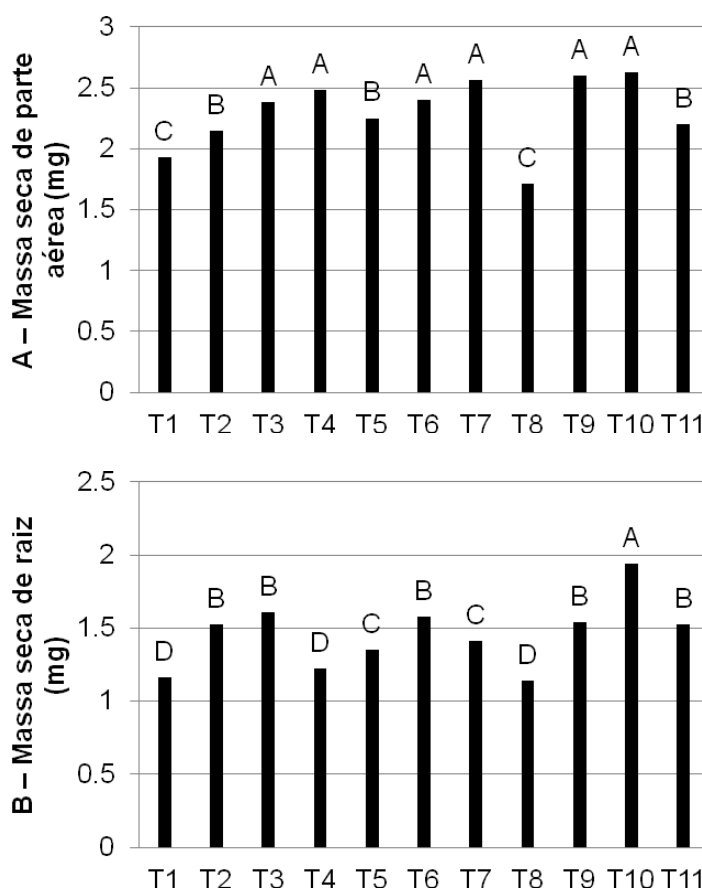
Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) comprimento de raiz: 18,7; comprimento de parte aérea: 11,6. Médias com mesma letra maiúscula ou minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O uso da microbiolização com *Trichoderma* spp. pela suspensão de esporos (T3), e da combinação de técnicas (T4) e de organismos (T9) proporcionou um incremento ao acúmulo de massa seca de parte aérea em relação ao uso das técnicas isoladas (T1 e T2) e da testemunha (T11) (Figura 13). Sobre o sistema radicular o uso da restrição hídrica seguida ou não pelo recobrimento reduziu o acúmulo de massa seca.

Para *B. subtilis*, o uso da peliculização e da suspensão proporcionaram incremento no acúmulo de massa seca de parte aérea em relação às sementes não tratadas e as demais formas de microbiolização. O uso da peliculização isolada foi o único método que não prejudicou o acúmulo de massa seca de raiz.

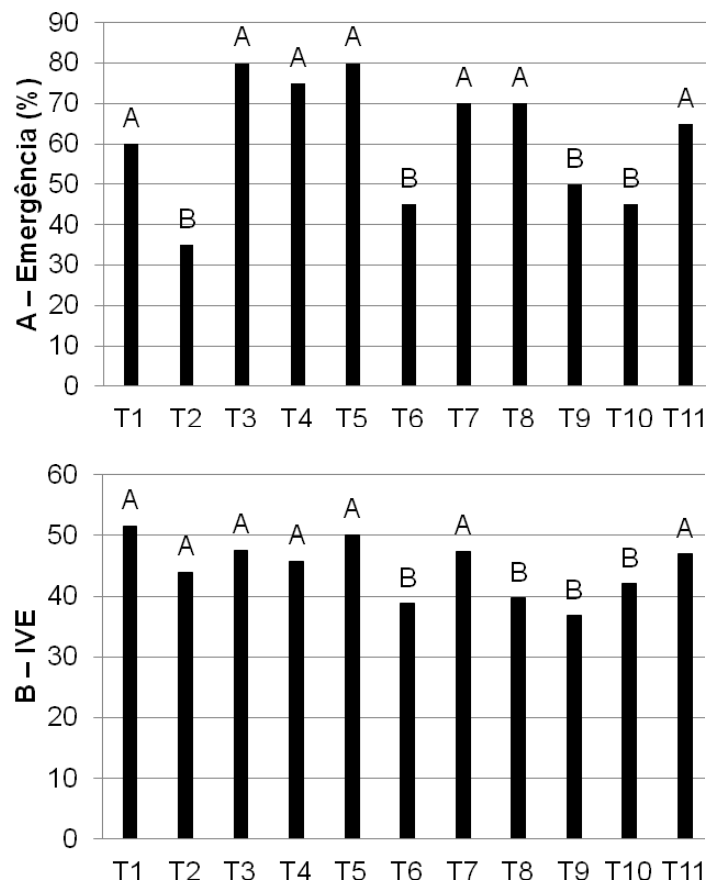
Na avaliação do desempenho dos tratamentos em casa de vegetação, o uso da peliculização isolada para os dois organismos, a utilização conjunta dos organismos com as técnicas (T9) e o tratamento químico reduziram a emergência das plântulas de feijão. Sendo o uso do *B. subtilis* pela peliculização, precedido ou não pelo condicionamento, T9 e o tratamento químico, responsáveis pela emergência mais lenta das plântulas (Figura 14). DINIZ et al. (2006) relataram que

houve aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência de plântulas de alface, cujas sementes foram microbiolizadas com *Trichoderma viride* pela técnica de peliculização. Respostas negativas de fungicidas químicos aplicados às sementes de algodão foram relatados por Faria et al. (2003), demonstrando retardo na emergência, menor comprimento da parte aérea e menor massa seca de plântulas.



**Figura 13** - Massa seca de parte aérea (A) e raiz (B) de plântulas do teste de germinação de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) massa seca de parte aérea: 14,1; massa seca de raiz: 14,6. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

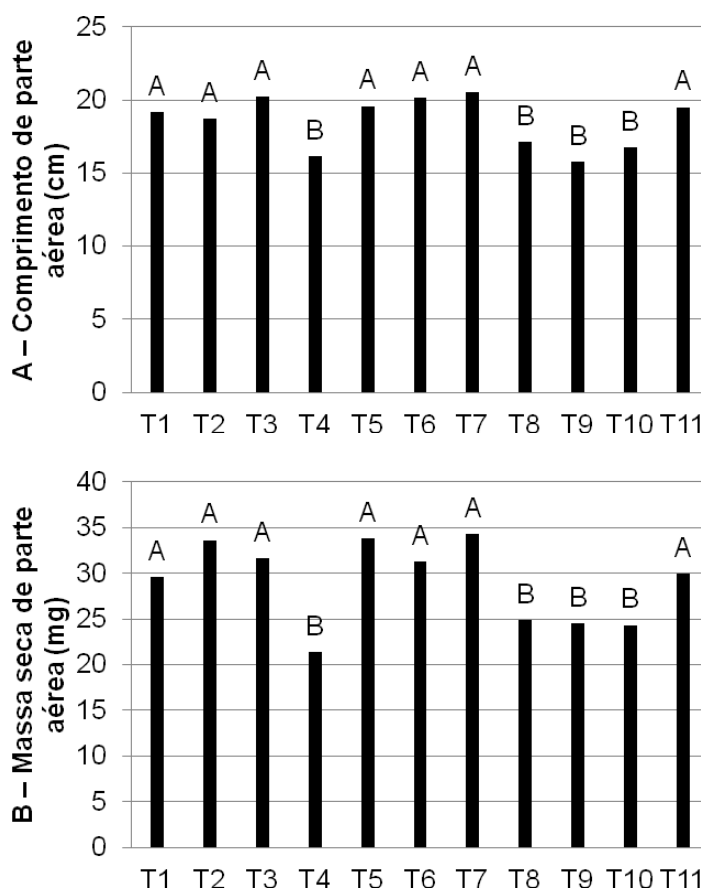


**Figura 14** – Emergência (A) e índice de velocidade de emergência (B) de plântulas oriundas de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos, cultivadas em copos plásticos em casa de vegetação.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) emergência: 8,3; IVE: 12,1. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Na avaliação da parte aérea de plântulas de feijão conduzidas em casa de vegetação, verifica-se que o recobrimento das sementes condicionadas, para os dois organismos e para a combinação destes reduziu comprimento e massa seca das plântulas cultivadas em copos (Figura 15) e também em canteiro (Tabela 10). Durante o condicionamento fisiológico, as sementes são hidratadas até que ocorra ativação e sintetização de enzimas, utilizadas para digestão das reservas acumuladas. Entretanto, o processo é interrompido antes da divisão e alongação

celular, para evitar danos ao embrião. Ao ser realizado o recobrimento, as sementes foram expostas a nova hidratação, oriunda da calda de aplicação do polímero, novamente ativando a síntese de enzimas e acarretando em degradação das reservas. HÖLBIG et al. (2011) observaram efeito semelhante, pois o uso de películas em ensaios com recobrimento de sementes de cebola hidrocondicionadas prejudicou o vigor das plântulas.



**Figura 15** - Comprimento (A) e massa seca (B) de parte aérea plântulas oriundas de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos, cultivadas em copos plásticos em casa de vegetação.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) comprimento de parte aérea: 12,5; massa seca de parte aérea: 22,8. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Ao ocorrer a emissão do primeiro trifólio, as plântulas já estão independentes da reserva da semente, passando a absorver os nutrientes do solo. A avaliação da largura do primeiro trifólio demonstrou efeito benéfico da microbiolização com *Trichoderma* spp. e *B. subtilis*, na expansão da primeira folha trifoliolada (Tabela 10). Tanto os métodos convencionais, quanto o uso da restrição hídrica e da peliculização isoladas, para *Trichoderma* spp. e para *B. subtilis*, como o uso da combinação das duas técnicas com os dois organismos promoveram desempenho superior aos demais tratamentos, demonstrando a continuidade dos benefícios do tratamento de sementes sobre plântulas já estabelecidas no solo. Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre o crescimento do sistema radicular, entretanto a metodologia de suspensão e o uso do condicionamento fisiológico promoveram maior acúmulo de matéria seca nas raízes. Outros trabalhos vêm destacando o efeito promotor de crescimento desses organismos. Aplicando formulação de *Bacillus subtilis* na solução nutritiva de alface infectada por *Pythium* spp., Corrêa et al. (2010) observaram maior acúmulo de massa nas plantas e Resende et al. (2004), ao verificarem que sementes de milho inoculadas com *Trichoderma harzianum* resultaram em plantas com maior acúmulo de matéria seca nas raízes.

Trabalhando com inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro, Sousa et al. (2008) verificaram que ao mudar do substrato papel para solo e areia, houve acentuada redução nos índices de doença, o que os autores atribuíram a alteração nas condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo, e por conseqüência à sua ação sobre o hospedeiro. Comportamento semelhante ao apresentado por *B. subtilis* e *Trichoderma* spp. na avaliação da emergência de plântulas de feijão no campo, não havendo efeito significativo de nenhum dos tratamentos aplicados.

**Tabela 10** – Médias do comprimento de parte aérea (CPA) (cm), massa seca de parte aérea (MAS) (mg), largura da primeira folia trofoliolada (TRF) (cm), massa seca de raiz (MRA) (mg) mensurados em plântulas cultivadas em canteiro e em copos em casa de vegetação produzidas a partir de sementes de feijão submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos	Canteiro <sup>(1)</sup>			Copos <sup>(1)</sup>	
	CPA	MAS	TRF	TRF	MRA
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	19 a *	32 a	7 a	5 a	11 a
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	18 a	29 a	6 b	4 b	9 b
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	17 a	27 a	6 b	5 a	10 a
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	16 b	24 b	4 c	3 b	6 b
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	18 a	28 a	6 b	5 a	10 a
<i>B. subtilis</i> + peliculização	18 a	28 a	6 b	5 a	8 b
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	18 a	27 a	5 c	5 a	10 a
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	16 b	23 b	5 c	4 b	8 b
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	16 b	23 b	4 c	4 a	7 b
Tratamento químico	18 a	28 a	5 c	3 b	9 b
Sem tratamento	18 a	30 a	5 c	4 b	8 b
CV (%)	6	12	12	24	20

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

### 3.4 Conclusões

- Sementes de feijão infectadas por *Rhizoctonia solani* não podem ser utilizadas para condicionamento fisiológico em meio de cultura.



- A microbiolização com o uso de suspensão de esporos ou de células bacterianas promove crescimento de plântulas de feijão, não necessitando outras técnicas para potencializar estes benefícios.
- O recobrimento de sementes condicionadas de feijão reduz a qualidade das sementes.
- *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* promovem crescimento de plântulas de feijão, estendendo seus benefícios até a plântula se tornar independente das reservas da semente.

### 3.5 Referências bibliográficas

ABEBE, A.T.; MODI, A.T. Hydro-Priming in Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Research Journal of Seed Science**, v.2, n.2. p.23-31, 2009.

ALVES, M. C. S.; et al. Germinação e vigor de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) peliculizadas e tratadas com fungicida. **Informativo ABRATES**, v. 13, n. 3, p. 219, 2003.

ARAÚJO, A.S.F. et al. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, 2010.

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.

BARNET, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 398p.

CARVALHO, D.C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, 2011.

CLEMENTE, F. M. V. T.; et al. Peliculização associada a doses de fungicida na qualidade fisiológica de sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Informativo ABRATES**, v.13, n. 3, p. 219, 2003.

CORREA, É. B.; BETTIOL, W.; SUTTON, J. C. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. **Summa phytopathologica**, v. 36, n. 4, p. 275-281, 2010.

COUTINHO, W. M. *et al.* Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.  
CQFS-RS/SC - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - SC/RS. **Manual de adubação e de calagem para Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 2004. 400p

CÚNDOM, M.A.; MAZZA, S.M.; GUTIÉRREZ, S.A. Short communication. Selection of *Trichoderma* spp. Isolates Against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, n.4, p.79-81, 2003.

DEUNER, C. C. et al. Inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão por meio da técnica de condicionamento fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 09-20, 2011.

DINIZ, K. A. et al. 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.

FARIA, A. Y. K. et al. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, 2003.

HÖLBIG, L.S.; BAUDET, L.; VILLELA, F.A. Hidrocondicionamento de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.171-176, 2011.

LISBOA, B.B. et al. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v.37, n.5, p. 1255-1260, 2007.

LOHMANN, T.R.; PAZUCH, D.; STANGARLIN, J.R.; SELZLEIN, C.; NACKE, H. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.1665-1668, 2007.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MANJULA, K.; PODILE, A.R.. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

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

MENEZES, M. Avaliação de espécies de *Trichoderma* no tratamento de feijão e do solo, visando o controle de *Macrophomina phaseolina*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**, 25, 1992, Gramado, RS. Resumos... Brasília: SBS, 159p, 1992.

ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

QUEIROZ, M.F.; FERNANDES, P.D.; ALMEIDA, F.A.C. Infecção de sementes e anormalidade de plântulas de feijão, em função do condicionamento osmótico induzido por polietileno glicol-6000. **Revista Brasileira Engenharia agrícola Ambiental**, v. 4, n. 3, 2000.

RESENDE, M.L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p.793-798, 2004.

ROBANI, H. Film-coating of horticultural seed. **HortTechnology**, v.4, p.104-105, 1994.

SBALCHEIRO et al. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do cretamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.1, p.29-37, 2009.

SILVEIRA, S. Recobertura como medida para proteção da semente. **Seed News**, n. 5, p. 34-35, 1998.

SOFO, A. et al. Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6<sup>®</sup> (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*) rootstock. **Environmental and Experimental Botany**, v.76, p. 33–38, 2012.

SOFO, A.; M. L.; TATARANNI, G.; Effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on the growth of two *Prunus* rootstocks during the rooting phase. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.85, p.497–502. 2010.

SOUSA, M. V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.41-48, 2008.

SPEROTTO, C.C.I.; MENEZES, N.L.; STORCK, L. Desempenho de sementes e plantas de feijoeiro sob efeito do condicionamento osmótico e da aplicação de zinco. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 253-257, 1999.

## CAPÍTULO IV

### TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE NABO FORRAGEIRO COM *Trichoderma* spp. E *Bacillus subtilis*

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi potencializar o efeito da microbiolização de sementes de nabo forrageiro com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização. A microbiolização com suspensão de estruturas biológicas foi realizada com os produtos comerciais Agrotich plus<sup>®</sup> e Rhizoliptus<sup>®</sup>. A restrição hídrica foi realizada em meio BDA + Manitol (- 0,7 MPa), para *Trichoderma* spp. ou para *Bacillus subtilis*, em cada placa foram distribuídas 100 sementes de nabo forrageiro previamente desinfestadas. Ao ocorrer protrusão radicular na primeira semente, as demais foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h. A peliculização foi realizada com a adição do polímero Color Seed<sup>®</sup> (300 mL kg<sup>-1</sup>) à calda de tratamento contendo *Trichoderma* spp. ou ao produto Rhizoliptus. As sementes foram secas por 48 h em ambiente de laboratório. Foi utilizado um tratamento recobrimo as sementes condicionadas com os organismos isolados ou em associação. A microbiolização com *Trichoderma* spp. pelo condicionamento fisiológico controla os patógenos infectantes das sementes. Ambos os organismos promovem o crescimento e desenvolvimento de plântulas de nabo forrageiro, sendo o recobrimento das sementes condicionadas na presença dos organismos o que proporciona maior crescimento de parte aérea de plântulas no campo.

**Palavras chave:** *Rhaphanus sativus*. Polímero. Condicionamento. Germinação. Sanidade.

## ABSTRACT

### TECHNIQUES MICROBIOLIZATION SEED FORAGE RADISH WITH *Trichoderma* spp. AND *Bacillus subtilis*

The objective of this study was the effect of leverage microbiolization forage radish seed with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* by physiological conditioning techniques, suspension of biological structures and film coating. The microbiolization suspension of biological structures was carried out with commercial products Rhizoliptus® and Agrotrich plus®. Fluid restriction was held in PDA medium + mannitol (- 0.7 MPa) for *Trichoderma* spp. or *Bacillus subtilis*, were distributed on each plate 100 forage radish seeds previously disinfected. When was the first seed radicle protrusion in the other were removed and dried in a laboratory environment for 48 h. The film coating was performed with the addition of the polymer Color Seed® (300 mL kg<sup>-1</sup>) treatment of the syrup containing *Trichoderma* spp. or product Rhizoliptus®. The seeds were dried for 48 h in a laboratory environment. We used a treatment covering the seeds primed with organisms, or their association. The microbiolization with *Trichoderma* spp. by physiological conditioning controls pathogens infecting the seeds. Both organizations promote the growth and development of seedlings of forage radish, and the coating of the seeds primed in the presence of organisms which provides greater shoot growth of seedlings in the field.

**Keywords:** *Rhaphanus sativus*. Polymer. Conditioning. Germination. Health.

## 4.1 Introdução

A microbiolização é uma técnica que utiliza organismos vivos para o tratamento de sementes. Tem como objetivo o controle de doenças e/ou promoção do crescimento de plantas (MELO, 1996), favorecendo a germinação de sementes, emergência e desenvolvimento das plântulas e produção de grãos e frutos (HARMAN, 2000). Constitui uma alternativa ao tratamento químico de sementes, que pode causar entre outros malefícios, intoxicações e contaminações, seleção de linhagens resistentes, desequilíbrio na população microbiana do solo, redução da biodiversidade e eliminação de organismos benéficos responsáveis pela ciclagem de nutrientes (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Entre os organismos que se destacam estão espécies do gênero fúngico *Trichoderma* spp. e bactérias do gênero *Bacillus*. *Trichoderma* spp. atua em diversos patossistemas: *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijão (CARVALHO et al., 2011); *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro (FIGUEIRÊDO et al., 2010); *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro (BOMFIM et al., 2010), entre outros. Assim como atua na promoção do crescimento e desenvolvimento de plantas: maior comprimento da parte aérea, aumento do número de folhas, raízes, e diâmetro do caule em microestacas do porta enxerto GiSeLa6 (*Prunus canescens* X *Prunus cerasus*) (SOFO et al., 2010; 2012), Melhoria na germinação, emergência e vigor em sementes de algodão (FARIA et al., 2003), maior acúmulo de matéria seca nas raízes de milho (RESENDE et al., 2004).

De mesmo modo *B. subtilis* também atua no controle de patógenos: *Colletotrichum acutatum* em frutos cítricos, com desempenho semelhante ao fungicida benomyl (KUPPER et al., 2003), na promoção de crescimento de plantas: incrementou o crescimento, desenvolvimento e a nutrição de plantas de milho (ARAÚJO, 2008; ARAÚJO; GUERREIRO, 2010).

Muitos microrganismos com habilidade biocontroladora e promotora de crescimento têm sido estudados, bem como a técnica utilizada na sua incorporação junto às sementes (HARMAN, 2000). Faria et al. (2003) destacam a necessidade de testes com diferentes formulações de *Trichoderma* spp. Araújo (2008) também demonstra que a formulação tem um valor significativo para determinar a eficácia final do produto baseado em rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.

Visando potencializar o efeito da microbiolização de sementes, e o sinergismo dos benefícios, faz-se uso da associação de técnicas, como o condicionamento fisiológico e a peliculização. O condicionamento fisiológico é baseado no controle da velocidade de embebição de água pelas sementes, pelo uso de soluções osmóticas ajustadas a potenciais hídricos que permitam a ocorrência dos processos fisiológicos iniciais, sem atingir umidade suficiente para que ocorra o alongamento celular e, conseqüentemente, a protrusão da radícula (BONOME et al., 2006). Esta técnica foi inicialmente utilizada para inoculação de patógenos em sementes sem comprometer sua viabilidade (SOUSA et al., 2008; DEUNER et al., 2011). Entretanto, pesquisadores vêm utilizando para microbiolização de sementes, a exemplo disso Andreoli; Andrade (2003) verificaram que a integração do condicionamento matricial com um tratamento biológico (*Bacillus*) é efetiva em aumentar o vigor das sementes de milho de menor qualidade.

O uso de películas no recobrimento de sementes confere aderência de insumos agrícolas às sementes, favorecendo sua veiculação (SILVEIRA, 1998). Utilizando a veiculação de *Trichoderma viride* pela técnica da peliculização, Diniz et al., (2006) constataram aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência de plântulas de alface.

Diante disso, este trabalho visa potencializar o efeito da microbiolização de sementes de nabo forrageiro com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização.

## 4.2 Material e métodos

Foi utilizado um lote de sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) provenientes do município de Cruz Alta – RS, Brasil. Antes da realização da determinação do potencial hídrico adequado e da aplicação dos tratamentos, as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, seguido de álcool 70% por 1 minuto e, três banhos em água destilada e esterilizada.



#### 4.2.1 – Determinação do potencial hídrico adequado para sementes de nabo forrageiro

O condicionamento fisiológico foi realizado em placas de petri contendo 50 mL do meio BDA adicionado do soluto manitol em diferentes potenciais hídricos (0,0 -0,6, -0,7, -0,8 e -0,9 MPa) (COUTINHO et al., 2001). Sobre as placas vertidas com o meio de cultura nos diferentes potenciais foram acondicionadas 100 sementes. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento (12h de luz a 25°C) até que houvesse protrusão radicular na primeira semente (Figura 16). As demais sementes foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h, para posteriormente ser instalado o teste de germinação em rolo. Para cada potencial testado foram utilizadas 200 sementes, separadas em oito repetições de 25 sementes. Os rolos do teste de germinação foram mantidos em germinador, com 12 h de luz e temperatura de 25 °C, por quatro dias, quando foi realizada a primeira contagem de germinação e, aos dez dias foram determinados os percentuais de plântulas normais e anormais e sementes mortas. Foi realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro, calculado o coeficiente de variação, e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).



**Figura 16** - Protrusão radicular em sementes de nabo (*Raphanus sativus* L.) condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol.

#### 4.2.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos:

As sementes foram submetidas ao teste de germinação, utilizando-se 200 sementes para cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotofase de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos quatro e dez dias e obteve-se o percentual de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

#### 4.2.3 – Aplicação dos tratamentos

Foram avaliados diferentes métodos de microbiolização (restrição hídrica, peliculização e suspensão), para dois produtos biológicos comerciais, um à base de agente bacteriano (*Bacillus subtilis*) (Rhizoliptus<sup>®</sup>) e outro, a base de agente fúngico (*Trichoderma* spp.) (Agrotrich<sup>®</sup>) sobre sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.).

Aplicação de suspensão de b biológicas sobre as sementes: A suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. foi obtida a partir de 10 g de Agrotrich<sup>®</sup> plus colocados em 100 mL de água destilada e esterilizada, sendo aplicado 0,5 mL da suspensão para cada 100 sementes. Para *Bacillus subtilis* foi aplicado 0,5 mL do produto comercial para cada 100 sementes. Após a microbiolização, as sementes foram colocadas para secar, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

Condicionamento fisiológico: Realizado em meio de cultura BDA acrescido do soluto Manitol -0,7MPa, sobre o qual foram repicados os organismos. *Trichoderma* spp. foi isolado do produto comercial Agrotrich<sup>®</sup>, as placas foram incubadas por 10 dias para que o fungo esporulasse abundantemente. A repicagem de *Bacillus subtilis* foi realizada com a aplicação de 0,5 mL do produto comercial Rhizoliptus<sup>®</sup> sobre cada placa, incubadas por 48 h para o crescimento e desenvolvimento da bactéria sobre o meio. Na microbiolização conjunta dos dois organismos foi aplicado 0,5 mL

para cada 100 sementes do produto a base de *Bacillus subtilis* e estas foram acondicionadas sobre placas contendo *Trichoderma* spp. Em cada placa, com os diferentes organismos, foram distribuídas 100 sementes de nabo forrageiro previamente desinfestadas sendo incubadas em germinador, com fotofase de 12 h e temperatura de 25°C, até que uma semente apresentasse o início de protrusão radicular. As demais sementes foram removidas do meio e colocadas a secar, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

**Peliculização:** Foi utilizado o polímero Collor Seed<sup>®</sup> He Vermelho, o qual foi aplicado conforme recomendação do fabricante, 300 mL do produto para cada 100 kg de sementes. Para cada 100 sementes foi preparada uma calda de tratamento adicionando a quantidade de polímero, referente ao peso da amostra, em 0,5 mL de suspensão de *Trichoderma* spp. ou do produto Rhizoliptus<sup>®</sup>. Em seguida as sementes foram secas, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

**Sementes sem tratamento:** As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, seguido de álcool 70% por 1 minuto e, três banhos em água destilada e esterilizada. Logo após, as sementes foram postas a secar em ambiente de laboratório por 48 h.

**Tratamento químico:** Foi utilizado o fungicida Captan SC (120 i.a.g/100 kg sementes) diluído em 0,5 mL de calda de tratamento de 100 sementes.

Foram utilizados 9 tratamentos de microbiolização: T1: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp.; T2: Peliculização + *Trichoderma* spp.; T3: suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp. seguido de peliculização; T5: Condicionamento fisiológico + *Bacillus subtilis*; T6: Peliculização + *Bacillus subtilis*; T7: suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: Condicionamento fisiológico + *Bacillus subtilis* seguido de peliculização; T9: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* seguido de peliculização. T10: Tratamento químico (testemunha positiva); e T11: sementes sem tratamento (testemunha negativa).

#### 4.2.4 – Avaliação dos tratamentos

Para avaliação do desempenho das sementes submetidas aos diferentes tratamentos, foram realizadas avaliações de sanidade, germinação, índice de velocidade de emergência, do crescimento e desenvolvimento de plântulas em casa de vegetação e desempenho a campo.

Para a mensuração da sanidade, foram utilizadas 200 sementes por tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes. Estas sementes foram colocadas em caixas "gerbox", previamente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, contendo duas folhas de papel filtro esterilizado, umedecidas com o herbicida 2,4-D a 0,5% para inibir a germinação. As sementes foram incubadas a 25 °C, com fotofase de 12 h, durante cinco dias e analisadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, para a observação das estruturas morfológicas dos fungos, os quais foram identificados ao nível de gênero com o auxílio de bibliografia especializada (BARNET; HUNTER, 1972), determinando-se o percentual de incidência de cada gênero fúngico.

Para o teste de germinação, foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotofase de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos quatro e dez dias conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), sendo avaliadas na primeira contagem as plântulas normais de cada repetição.

Do teste de germinação foram separadas, aleatoriamente, dez plântulas e medido o comprimento de parte aérea e de raiz. Devido ao volume reduzido, foi realizada a determinação de massa seca média total, em estufa a 60 °C por 48 h. Aos dez dias de incubação, as plântulas foram classificadas em normais fortes, fracas e anormais e sementes mortas e obteve-se o percentual de germinação em cada tratamento de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Foi conduzido um ensaio para avaliação das plântulas em casa de vegetação, sendo irrigado diariamente. Foram semeadas quatro repetições de cinco sementes em copos plásticos contendo 60 g de substrato comercial (Carolina Soil®). Foi

utilizado o delineamento inteiramente casualizado, e a avaliação realizada 10 dias após a semeadura. Foram realizadas determinações da largura da primeira folha, diâmetro do colo, comprimento do sistema radicular e da parte aérea e massa seca do sistema radicular e da parte aérea.

A determinação do índice de velocidade de emergência (IVE) foi realizada em bandejas alveoladas de 200 células, com uma semente por célula, utilizando substrato comercial (Carolina Soil<sup>®</sup>). Foram realizadas contagens diárias das plântulas emergidas até obter-se número constante e assim, determinou-se o índice de velocidade de emergência. Para cada repetição, foi calculado o IVE, somando-se o número de plantas emergidas a cada dia, dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da semeadura, conforme Maguire (1962). Após a emergência tornar-se constante foi determinado o percentual de plântulas emergidas.

A avaliação do desempenho das plântulas em campo foi realizada no município de Santa Maria (29° 46' 56,03" S; 53° 44' 33,62" O) em solo com principais características minerais descritas na tabela 11. A análise completa encontra-se no anexo 2. A semeadura foi realizada em delineamento blocos ao acaso com quatro repetições. Para cada parcela foram semeadas quatro linhas de cultivo espaçadas em 20 cm, sendo as avaliações realizadas nas duas linhas centrais. Foi utilizada bordadura com sementes sem tratamento entre as parcelas, e o espaçamento entre plantas adotado foi de 5 cm. A semeadura foi realizada manualmente, com duas sementes por cova. A adubação foi realizada conforme as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004).

Aos 18 dias após a semeadura foi realizada a avaliação de percentual de emergência seguida pelo desbaste, deixando apenas uma planta por cova. Transcorridos 28 dias após a semeadura, foi realizada a determinação da altura das plântulas com auxílio de uma régua milimetrada, e contabilizado o número de folhas por plântulas. As plantas ao apresentarem 50% do florescimento (75 dias após a semeadura), foram coletadas uma das linhas centrais de cada bloco. As plantas foram seccionadas a partir do colo e foi realizada a determinação de massa seca média de planta em estufa a 60 °C, até atingir peso constante.

Para todas as variáveis avaliadas foi calculada a média e realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro, e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de

5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).

**Tabela 11** – Teores de argila, matéria orgânica (MO), pH em água, saturação por bases (V), fósforo extraído pelo método Mehlich-1 (P) e potássio (K), e suas interpretações.

Diagnóstico da fertilidade do solo						
Argila (%)	MO (%)	pH em água	V (%)	Saturação por alumínio (CTC efetiva)	K	P
14	1,1	4,4	7,2	2,2	24	1,5
Textura 4	Baixo	Muito baixo	Muito baixo	baixo	Baixo	Muito baixo

Fonte: CQFS-RS/SC (2004).

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 – Determinação do potencial hídrico adequado para sementes de nabo forrageiro

A protrusão radicular da primeira semente ocorreu 18h após a incubação em meio BDA e no potencial -0,6 MPa, após 22h no potencial -0,7 MPa, e transcorridas 29h sob o potencial -0,8 e -0,9 MPa. A restrição hídrica, a partir do potencial -0,8 MPa, foi prejudicial à germinação, primeira contagem de germinação e elevou o percentual de plântulas anormais (Tabela 12). Apesar de os potenciais inferiores não terem diferido entre si e do uso do meio de cultura sem adição de restritor, o potencial -0,7 MPa apresentou valores absolutos superiores aos demais em todas as variáveis analisadas. Assim sendo, foi este o potencial utilizado para condicionamento das sementes em meio de cultura. Hardegree; Emmerich (1992)

destacaram que maiores porcentagens de germinação são obtidas em tratamentos com pressões osmóticas mais negativas, para quatro espécies de gramíneas. Outros pesquisadores observaram que potenciais osmóticos mais negativos reduziram a germinação das sementes, como demonstrado para quaresminha (*Miconia candolleana*) por Borges et al. (1994) e para soja (*Glycine max*) por Braccini et al. (1996).

**Tabela 12** - Médias (%) de plântulas normais aos quatro dias (PN 4d), plântulas normais aos dez dias (PN 10d), sementes mortas (SMO) e plântulas anormais (PAN) de sementes de nabo forrageiro condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol em diferentes potenciais hídricos.

Tratamentos (MPa)	PN 4d	PN 10d	SMO	PAN
0,0	86 a*	88 a	0 a	8 b
-0,6	85 a	85 a	3 a	11 b
-0,7	87 a	92 a	1 a	7 b
-0,8	58 b	63 b	10 a	26 a
-0,9	57 b	62 b	6 a	30 a
CV(%)	8	9	2	46

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

#### 4.3.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos

Na avaliação inicial da germinação das sementes, o lote apresentou 83% de sementes germinadas, sendo 78% a primeira contagem de germinação. Não houve ocorrência de sementes duras, indicando que não havia dormência nas sementes.

#### 4.3.3 – Avaliação dos tratamentos

Todos os métodos de microbiolização foram semelhantes na eficiência de colonização por *Trichoderma* spp. O uso da restrição hídrica potencializou o efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp., não ocorrendo a incidência dos patógenos quando foi realizada esta forma de microbiolização (Tabela 13). Entretanto, a utilização de outra técnica, que não restrição hídrica, para *Trichoderma* spp. e independente da técnica para *B. subtilis*, favoreceram ou não inferiram sobre a incidência de *Fusarium* sp. A microbiolização com *B. subtilis*, independente da técnica, também favoreceu a incidência de *Alternaria* sp. Utilizando suspensão de esporos como forma de microbiolização com *Trichoderma* spp., Carvalho et al. (2011) obtiveram redução na incidência de *Fusarium oxysporum* em sementes de feijão de até 51%. Utilizando um produto em formulação pó a base de *Trichoderma* spp., Ethur et al. (2006) obtiveram 100% de controle de todos os fungos associados a sementes de nabo forrageiro e demonstraram que o organismo proveniente do tratamento de sementes foi capaz de colonizar o solo da rizosfera das plântulas. O controle de patógenos exercido pelos organismos pode ir além daqueles associados às sementes. Araujo e Menezes (2009) verificaram que a aplicação de *B. subtilis* no solo promoveu o controle de doenças de parte aérea em tomateiro, com eficiência semelhante ao fungicida químico.

Na avaliação da germinação, a microbiolização com *B. subtilis* teve melhor desempenho do que *Trichoderma* spp., sendo favorecida pelo uso de película (Figura 17). A ação de *B. subtilis* sobre a germinação de sementes foi relatada por Manjula; Podile (2005) que obtiveram maior rapidez de germinação em sementes de feijão guandu tratadas com formulação a base de *B. subtilis* AF1 em turfa suplementada com quitina, verificando ainda, aumento da emergência e peso seco das mudas de 29 a 33%. Os demais tratamentos aplicados às sementes de nabo forrageiro prejudicaram a germinação, sendo *Trichoderma* spp. mais prejudicial. O uso de suspensão de esporos não alcançou 10% de germinação, sendo que este método e o recobrimento das sementes condicionadas na presença dos dois organismos ocasionaram mortalidade de sementes acima de 20%. As condições em que os rolos de germinação ficam expostos, alta umidade e temperatura, induzem a ação saprofítica de *Trichoderma* spp. resultando em comprometimento da



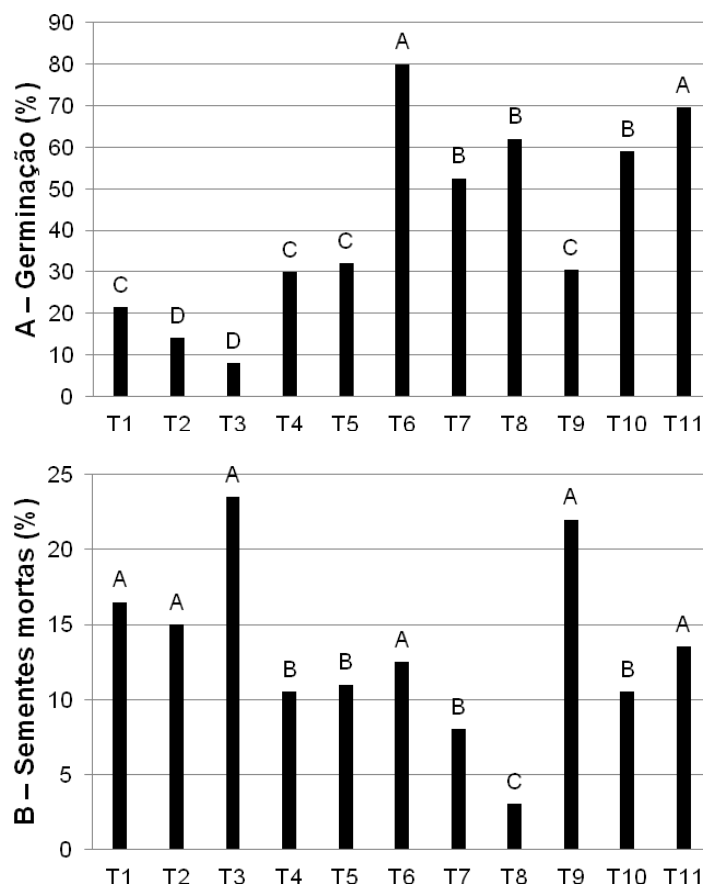
germinação. O recobrimento das sementes condicionadas na presença de *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* separadamente, reduziu a mortalidade das sementes. Pereira et al. (2005) verificaram que a peliculização não interferiu no efeito de tratamento químico aplicado e não afetou a qualidade fisiológica de sementes de milho. Entretanto Diniz et al., (2006) relataram que a veiculação de *Trichoderma viride* pela técnica da peliculização promoveu aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência de plântulas de alface.

**Tabela 13** – Incidência (%) de *Trichoderma* spp. (TRI), *Fusarium* sp. (FUS), *Alternaria* sp. (ALT) em sementes de nabo forrageiro submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos	TRI	FUS	ALT
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	100 a *	0 c	0 c
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	100 a	12 a	0 c
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	98 a	15 a	1 c
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	100 a	0 c	0 c
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	1 c	9 a	23 a
<i>B. subtilis</i> + peliculização	0 c	7 a	12 b
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	0 c	2 b	9 b
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	0 c	10 a	21 a
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	100 a	0 c	0 c
Tratamento químico	0 c	2 b	1 c
Sem tratamento	19 b	5 b	1 c
CV (%)	7	56	60

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A microbiolização com *B. subtilis* com o uso de película estimulou o vigor das plântulas, expresso por maiores valores na primeira contagem e maior percentual de plântulas fortes, assim como promoveu baixa inferência sobre anormalidades em plântulas (Tabela 14). Entretanto, as demais formas de microbiolização acarretaram anormalidades nas plântulas. *Trichoderma* spp. prejudicou o vigor das plântulas em todas as metodologias utilizadas, de mesmo modo prejuízos ao vigor foram observados pelo uso da restrição hídrica associada à *B. subtilis*.



**Figura 17** – Percentual de germinação (A) e sementes mortas (B) no teste de germinação de sementes de nabo forrageiro submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) germinação: 28,7; sementes mortas: 37,6. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

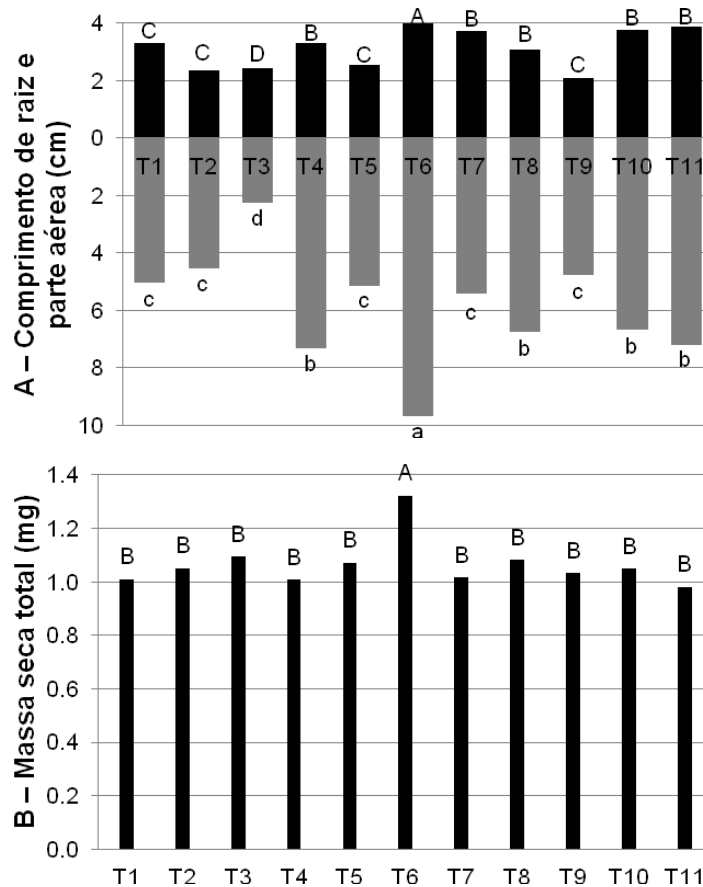
**Tabela 14** – Médias (%) da primeira contagem (PCO), plântulas normais (PNO), plântulas fracas (PFR) e plântulas anormais (PAN) de sementes de nabo forrageiro submetidas à diferentes tratamentos.

Tratamentos	PCO	PNO	PFR	PAN
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	20 c *	20 c	1 c	62 a
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	14 d	14 d	0 c	71 a
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	8 d	8 d	0 c	68 a
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	23 c	24 c	6 a	59 b
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	29 c	29 c	3 b	57 b
<i>B. subtilis</i> + peliculização	75 a	77 a	2 b	7 d
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	49 b	49 b	3 b	39 c
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	55 b	57 b	5 b	35 c
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	28 c	28 c	2 b	47 b
Tratamento químico	42 b	50 b	9 a	30 c
Sem tratamento	55 b	59 b	10 a	17 d
CV (%)	28	28	80	28

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A microbiolização com *B. subtilis* associada ao polímero promoveu maior crescimento de parte aérea e radicular assim como maior acúmulo de massa seca (Figura 18). Efeito benéfico de promoção de crescimento em plantas produzido por *Bacillus subtilis* foi relatado para *Eucalyptus* spp. por Mafia et al. (2007); Mafia et al. (2009). Maior crescimento e nutrição de plantas de milho utilizando formulação de *B. subtilis* com farinha de ostras (ARAÚJO 2008). Maior crescimento e acúmulo de massa de parte aérea de tomateiro tratado com *B. subtilis* (ARAÚJO; MARCHESI, 2009). Nas condições do teste em rolo de papel, o uso isolado das técnicas de microbiolização com *Trichoderma* spp. prejudicou o crescimento de parte aérea assim como do sistema radicular das plântulas de nabo forrageiro. Entretanto, o

recobrimento das sementes condicionadas teve desempenho semelhante às sementes não tratadas para ambas as variáveis.



**Figura 18** – Comprimento (A) e massa seca (B) de plântulas do teste de germinação de sementes de nabo forrageiro submetidas a diferentes tratamentos

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) comprimento de raiz: 22,1; comprimento de parte aérea: 14,6; massa seca total: 18,1. Médias com mesma letra maiúscula ou minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O comportamento deletério da microbiolização observado nas variáveis mensuradas em rolo de germinação não foi reproduzido no cultivo em substrato, em casa de vegetação (Tabela 15). Nestas condições, a microbiolização promoveu maior comprimento do sistema radicular e total e maior largura da primeira folha

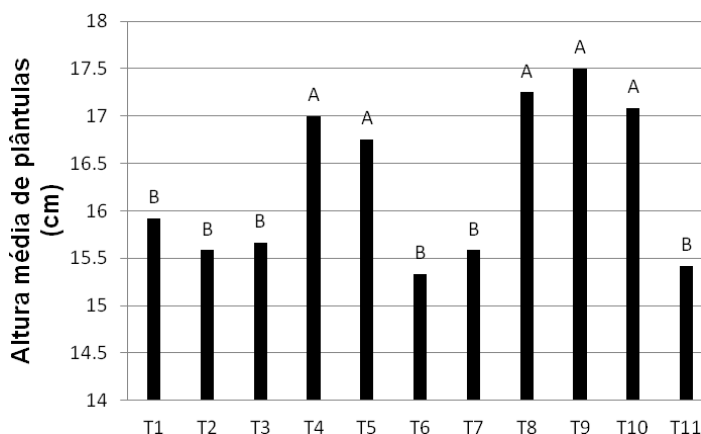
(Figura 19), demonstrando persistência dos benefícios mesmo a partir da independência das reservas da semente. Alguns tratamentos reduziram o índice de velocidade de emergência, mas não houve reflexo sobre o percentual de plântulas emergidas. Não foi verificado efeito dos tratamentos sobre o número de folhas, o diâmetro do colo, comprimento de parte aérea e acúmulo de massa seca. Ethur et al. (2006) observaram que *Trichoderma* spp. não influenciou o percentual de plântulas emergidas e a velocidade de emergência de plântulas de nabo. Entretanto, as plântulas produzidas a partir de sementes tratadas com o fungo, associado ou não à tratamento químico, apresentaram maior altura.

O uso de técnicas de microbiolização de sementes com *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* demonstrou a ação dos organismos como promotores de crescimento de plântulas de nabo forrageiro, conduzidas em campo, sob condições de baixa fertilidade natural, produzindo plântulas com maior comprimento de parte aérea (Figura 19). O rápido crescimento inicial das plântulas de nabo favorece o fechamento do dossel, característica de vital importância por se tratar de uma planta com finalidade de cobertura de solo. Os melhores desempenhos puderam ser observados ao se utilizar o recobrimento das sementes condicionadas na presença dos organismos separadamente, bem como associados, contrapondo os resultados de HÖLBIG et al. (2011) que observaram que o uso de películas em ensaios com recobrimento de sementes de cebola hidrocondicionadas prejudicou o vigor das plântulas. De mesmo modo, efeito benéfico do condicionamento fisiológico também pode ser observado na microbiolização isolada de *B. subtilis*, proporcionando desempenho semelhante ao tratamento químico. Contudo não foi observada diferença entre os tratamentos na avaliação da emergência, número de folhas e massa seca de plantas.

**Tabela 15** – Médias de comprimento de raiz (CRA), comprimento total (CTO), largura da primeira folha verdadeira (LFO), índice de velocidade de emergência (IVE) em plântulas cultivadas em casa de vegetação oriundas de sementes de nabo forrageiro submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos	CRA	CTO	LFO	IVE
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	34 a*	46 a	3 b	6 a
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	33 a	44 a	3 b	5 b
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	38 a	48 a	3 b	5 b
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	28 b	40 b	3 b	5 a
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	32 a	44 a	4 b	6 a
<i>B. subtilis</i> + peliculização	34 a	45 a	4 b	5 a
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	28 b	39 b	3 b	5 b
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	32 a	43 a	4 b	6 a
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	25 b	36 b	5 a	6 a
Tratamento químico	29 b	41 b	3 b	6 b
Sem tratamento	22 b	33 b	3 b	6 a
CV (%)	17	13	15	7

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 19** - Altura média de plântulas de nabo forrageiro oriundas de sementes submetidas a diferentes tratamentos conduzidas à campo.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) altura média de plântulas: 7,6. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

#### 4.4 Conclusões

- *Trichoderma* spp. microbiolizado pela restrição hídrica controla *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp. associados as sementes de nabo forrageiro.
- *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* promovem o crescimento e desenvolvimento de plântulas de nabo forrageiro.
- A microbiolização de sementes de nabo forrageiro, com suspensão de estruturas biológicas, não expressa o potencial dos organismos.
- O uso da peliculização na microbiolização de *B. subtilis* produz melhorias no crescimento e acúmulo de matéria seca em plântulas.
- O recobrimento das sementes condicionadas na presença de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. estimula o crescimento de parte aérea de plântulas no campo.

#### 4.5 Referências bibliográficas

ANDREOLI, C.; ANDRADE, R. V. DE. Efeito do matricionamento integrado com controle químico e biológico na emergência de plântulas e na produtividade de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 3, p. 132-142, 2003.

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.

ARAUJO, F. F.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.

ARAUJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1558-1561, 2009.

ARAUJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

BARNET, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241p.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. P.7-14.

BOMFIM et al. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.

BONOME, L.T.D.S. et al. Efeito do condicionamento osmótico em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Ciência agrotecnologia**, v. 30, n.3, 2006.

BORGES, E. E. L.; SILVA, L. F.; BORGES, R. C. G. Avaliação do osmocondicionamento na germinação de sementes de quaresminha (*Miconia candolleana* Triana). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 90-94, 1994.



BRACCINI, A. L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, Manitol e polietileno glicol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 1, p. 10-16, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 398p.

CANTERI, M. G., et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CARVALHO, D.C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, 2011.

COUTINHO, W. M. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

CQFS-RS/SC - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - SC/RS. **Manual de adubação e de calagem para Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 2004. 400p

DEUNER, C.C. et al. Inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão por meio da técnica de condicionamento fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.09-20, 2011.

DINIZ, K. A. et al. Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alfaca pela técnica de peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 37-43, 2006.

ETHUR et al. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, v.28, n.2, p.17-27, 2006.

FARIA, A.Y.K. et al. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.121-127, 2003.

FIGUEIRÊDO, G. S. et al. Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and Pathogenicity to Bean Plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53 n.1: p. 1-9, 2010.

HARDEGREE, S. P.; EMMERICH, W. E. Effect of polyethylene glycol exclusion on the water potential of solution-saturated filter paper. **Plant Physiology**, v. 92, n. 2, p. 462-466, 1992.

HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-393, 2000.

HÖLBIG, L.S.; BAUDET, L.; VILLELA, F.A. Hidrocondicionamento de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.171-176, 2011.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.251-257, 2003.

MAFIA, R. G. et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, v. 31, n. 4, p. 589-597, 2007.

MAFIA, R. G. et al. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

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

PEREIRA, C.E. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho tratadas associadas a polímeros durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.6, p.1201-1208, 2005.

RESENDE, M.L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p.793-798, 2004.

SILVEIRA, S. Recobertura como medida para proteção da semente. **SeedNews**, n.5, p.34-35, 1998.

SOFO, A. et al. Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6<sup>®</sup> (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*) rootstock. **Environmental and Experimental Botany**, v.76, p. 33–38, 2012.

SOFO, A.; MILELLA, L.; TATARANNI, G.; Effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on the growth of two *Prunus* rootstocks during the rooting phase. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.85, p.497–502. 2010.

SOUSA, M. V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.41-48 ,2008.



**CAPÍTULO V**  
**TÉCNICAS DE MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE AVEIA**  
**PRETA COM *Trichoderma* spp. E *Bacillus subtilis***

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi potencializar o efeito da microbiolização de sementes de aveia preta com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização. A microbiolização com suspensão de estruturas biológicas foi realizada com os produtos comerciais Agrotich plus<sup>®</sup> e Rhizoliptus<sup>®</sup>. A restrição hídrica foi realizada em meio BDA + Manitol (- 0,8 MPa), para *Trichoderma* spp. ou para *Bacillus subtilis*. Em cada placa foram distribuídas 100 sementes de aveia preta desinfestadas. Ao ocorrer protrusão radicular na primeira semente, as demais foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h. A peliculização foi realizada com a adição do polímero Color Seed<sup>®</sup> (300 mL kg<sup>-1</sup>) à calda de tratamento contendo *Trichoderma* spp. ou ao produto Rhizoliptus. As sementes foram secas por 48 h em ambiente de laboratório. Foi utilizado um tratamento recobrando as sementes condicionadas com os organismos, individualmente ou em associação. *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* tem ação variável conforme a técnica de microbiolização utilizada. Ambos atuam no controle de patógenos associados às sementes de aveia preta. *B. subtilis* promove a germinação de sementes de aveia preta, o desempenho e o crescimento das plântulas, e o acúmulo de matéria seca em plantas. *Trichoderma* spp. proporciona crescimento de parte aérea de plântulas e acúmulo de matéria seca em plantas. Entretanto, técnicas como condicionamento fisiológico e peliculização, comprometem a germinação e a emergência de plântulas de aveia preta e a utilização apenas da suspensão de estruturas biológicas não produz tais malefícios.

**Palavras chave:** *Avena strigosa*. Polímero. Condicionamento fisiológico. Germinação. Sanidade,

## ABSTRACT

### TECHNIQUES MICROBIOLIZATION OF OATS BLACK SEEDS WITH *Trichoderma* spp AND *Bacillus subtilis*

The objective of this study was the effect of leverage microbiolization oat seed with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* by physiological conditioning techniques, suspension of biological structures and film coating. The microbiolization suspension of biological structures was carried out with commercial products Rhizoliptus<sup>®</sup> and Agrotrich plus<sup>®</sup>. Fluid restriction was held in PDA medium + mannitol (- 0.8 MPa) for *Trichoderma* spp. or *Bacillus subtilis*, were distributed on each plate 100 sterilized oat seeds. When was the first seed radicle protrusion in the other were removed and dried in a laboratory environment for 48 h. The film coating was performed with the addition of the polymer Color Seed<sup>®</sup> (300 mL kg<sup>-1</sup>) treatment of the syrup containing *Trichoderma* spp. or product Rhizoliptus<sup>®</sup>. The seeds were dried for 48 h in a laboratory environment. We used a treatment covering the seeds primed with organisms, or their association. *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* has action vary according to the technique used microbiolization. Both act in the control of pathogens associated with seeds of oat. *B. subtilis* promotes the germination of oats, performance and seedling growth and dry matter accumulation in plants. *Trichoderma* spp. provides growth and seedling shoot dry matter accumulation in plants. However, techniques such as conditioning and physiological film coating undertake germination and seedling emergence of oat and the sole use of the spore suspension does not produce such harm.

**Keywords:** *Avena strigosa*. Polymer. Conditioning. Germination. Sanity,

## 5.1 Introdução

O condicionamento osmótico (restrição hídrica, hidrocondicionamento, osmocondicionamento ou “priming”) visa conferir maior uniformidade e sincronização da germinação, elevar o índice de emergência e desenvolvimento das plântulas, mesmo em solos com baixos teores de umidade, visa elevar a taxa de crescimento da parte aérea e maior rapidez no amadurecimento, como demonstrado por Marcos Filho (2005).

Esta técnica vem sendo utilizada para melhorar o desempenho de sementes de várias espécies (HÖLBIG et al., 2010; HÖLBIG et al., 2011) e associada à meios de cultivo para inoculação de patógenos, intensificando a infecção sem comprometer as características germinativas das sementes. Trabalhando com inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens* em sementes de feijão por meio da técnica de condicionamento fisiológico, Deuner et al. (2011) obtiveram eficiente associação da bactéria com as sementes, não comprometendo a qualidade fisiológica. Da mesma forma, a técnica de condicionamento fisiológico através da restrição hídrica, associada ao patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, possibilitou a obtenção de sementes de algodão efetivamente infectadas, porém ainda com capacidade germinativa para utilização em estudos de transmissibilidade do patógeno das sementes para a planta, conforme ensaios de Sousa et al. (2008).

O uso de polímeros em tratamentos de sementes visa, entre outros benefícios, aumentar a aderência e eficiência dos produtos aplicados. Diniz et al., (2006) utilizaram a técnica da peliculização para veiculação de *Trichoderma viride*, obtendo aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência de plântulas de alface.

O tratamento de sementes antes da semeadura através da microbiolização tem sido utilizado com resultados satisfatórios, caracterizando uma alternativa ao uso de insumos químicos, visando o controle de doenças, além de promover o crescimento de plantas, através da aplicação de microrganismos vivos (MELO, 1996), como *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*.

*Trichoderma* spp. destaca-se pelo antagonismo a diversos patógenos e pela ação na promoção de crescimento em plantas. A ação antagonista desse fungo ocorre em função de hiperparasitismo, pela competição por espaço, nutrientes e

oxigênio (MARTINS-CORDER; MELO, 1998; CHET et al., 1997; CHET; INBAR, 1994) e antibiose. Atua na promoção do crescimento de plantas pela produção de metabólitos e compostos específicos estimulantes de crescimento, enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos e permeazes de carbono e nitrogênio (BENITÉZ et al., 2004), e pela ação indireta sobre nutrientes do solo (ALTOMARE et al., 1989; BAKER, 1989).

De mesmo modo, *Bacillus subtilis* tem ação direta ou indireta no biocontrole de fitomoléstias (RYU et al., 2004; ONGENA et al., 2007; LEELASUPHAKUL et al., 2008). O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos ocorre através de antibiose, síntese de substâncias antimicrobianas, parasitismo, competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008). O mecanismo de antagonismo indireto é exercido pela indução de resistência sistêmica (LANNA FILHO et al., 2010). Sua atuação na promoção de crescimento de plantas tem sido relatada para várias espécies, sendo atribuída à síntese de fito-hormônios, como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas e citocininas, que favorecem o crescimento das raízes e o aumento no número de pelos radiculares (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999), aumento fisiológico de metabólitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular as condições externas, proporcionando a facilitação da percepção e absorção de nutrientes (MANJULA; PODILE, 2005).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi potencializar o efeito da microbiolização de sementes de aveia preta com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* pelas técnicas de condicionamento fisiológico, suspensão de estruturas biológicas e peliculização.

## 5.2 Material e métodos

Foram utilizadas sementes de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb), cultivar Agro Coxilha, provenientes do município de Santa Maria – RS, Brasil. Antes da realização da determinação do potencial hídrico adequado e da aplicação dos tratamentos as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, seguido de álcool 70% por 1 minuto e, três banhos em água destilada e esterilizada.



### 5.2.1 – Determinação do potencial hídrico adequado para sementes de aveia preta

O condicionamento fisiológico foi realizado em placas de petri contendo 50 mL do meio BDA adicionado do soluto manitol em diferentes potenciais hídricos (0,0 -0,6, -0,7, -0,8 e -0,9 MPa) (COUTINHO et al., 2001). Sobre as placas vertidas com o meio de cultura nos diferentes potenciais foram acondicionadas 100 sementes. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento (12h de luz a 25°C) até que houvesse protrusão radicular na primeira semente (Figura 20). As demais sementes foram retiradas e secas em ambiente de laboratório por 48 h, para posteriormente ser instalado o teste de germinação em rolo. Para cada potencial testado foram utilizadas 200 sementes, separadas em oito repetições de 25. Os rolos do teste de germinação foram mantidos em germinador, com 12 h de luz e temperatura de 25 °C, por cinco dias, quando foi realizada a primeira contagem de germinação e, aos dez dias foram determinados os percentuais de germinação, plântulas anormais e sementes mortas. Foi realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro, calculado o coeficiente de variação, e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM - Agri (CANTERI et al, 2001).



**Figura 20** - Protrusão radicular em sementes de aveia preta (*Avena stringosa*) condicionadas em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol.

### 5.2.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos

As sementes foram submetidas ao teste de germinação em rolo de papel, para tal, foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotofase de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos cinco e dez dias e obteve-se o percentual de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### 5.2.3 – Aplicação dos tratamentos

Foram avaliados diferentes métodos de microbiolização (restrição hídrica, peliculização e suspensão de estruturas biológicas), para dois produtos biológicos comerciais, um à base de agente bacteriano (*Bacillus subtilis*) (Rhizoliptus®) e outro, a base de agente fúngico (*Trichoderma* spp.) (Agrotrich®) sobre sementes de aveia preta.

Aplicação de suspensão de estruturas biológicas sobre as sementes: A suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. foi obtida a partir de 10 g de Agrotrich® plus colocados em 100 mL de água destilada e esterilizada, sendo aplicado 0,5 mL da suspensão para cada 100 sementes. Para *Bacillus subtilis* foi aplicado 0,5 mL do produto comercial para cada 100 sementes. Após a microbiolização, as sementes foram secadas, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

Condicionamento fisiológico: Realizado em meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol -0,8MPa, sobre o qual foram repicados os organismos. *Trichoderma* spp. foi isolado do produto comercial Agrotrich®, as placas foram incubadas por 10 dias para que o fungo esporulasse abundantemente. A repicagem de *Bacillus subtilis* foi realizada com a aplicação de 0,5 mL do produto comercial Rhizoliptus® sobre cada placa, incubadas por 48 h para o crescimento e desenvolvimento da bactéria sobre o meio. Na microbiolização conjunta dos dois organismos foi aplicado 0,5 mL

para cada 100 sementes do produto a base de *Bacillus subtilis* e estas foram acondicionadas sobre placas contendo *Trichoderma* spp. Em cada placa, com os diferentes organismos, foram acomodadas 100 sementes de nabo forrageiro previamente desinfestadas sendo incubadas em germinador, com fotofase de 12 h e temperatura de 25°C, até que uma semente apresentasse o início de protrusão radicular. As demais sementes foram removidas do meio e colocadas a secar, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

**Peliculização:** Foi utilizado o polímero Collor Seed<sup>®</sup> He Vermelho, o qual foi aplicado conforme recomendação do fabricante, 300 mL do produto para cada 100 kg de sementes. Para cada 100 sementes foi preparada uma calda de tratamento adicionando a quantidade de polímero, referente ao peso da amostra, em 0,5 mL de suspensão de *Trichoderma* spp. ou do produto Rhizoliptus<sup>®</sup>. Em seguida as sementes foram secas, sobre papel filtro, em condições de laboratório por 48 h.

**Sementes sem tratamento:** As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, seguido de álcool 70% por 1 minuto e, três banhos em água destilada e esterilizada. Logo após, as sementes foram secas em ambiente de laboratório por 48 h.

**Tratamento químico:** Foi utilizado o fungicida Captan SC (120 i.a.g/100 kg sementes) diluído em 0,5 mL de calda de tratamento de 100 sementes.

Foram utilizados 9 tratamentos de microbiolização: T1: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp.; T2: Peliculização + *Trichoderma* spp.; T3: suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp. seguido de peliculização; T5: Condicionamento fisiológico + *Bacillus subtilis*; T6: Peliculização + *Bacillus subtilis*; T7: suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: Condicionamento fisiológico + *Bacillus subtilis* seguido de peliculização; T9: Condicionamento fisiológico + *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* seguido de peliculização. T10: Tratamento químico (testemunha positiva); e T11: sementes sem tratamento (testemunha negativa).

#### 5.2.4 – Avaliação dos tratamentos

Para avaliação do desempenho das sementes submetidas aos diferentes tratamentos, foram realizadas avaliações de sanidade, germinação, índice de velocidade de emergência, do crescimento e desenvolvimento de plântulas em copos plásticos e desempenho a campo.

Para a mensuração da sanidade, foram utilizadas 200 sementes por tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes. Estas foram colocadas em caixas "gerbox", previamente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, contendo duas folhas de papel filtro esterilizado, umedecidas com o herbicida 2,4-D a 0,5% para inibir a germinação. As sementes foram incubadas a 25 °C, com fotofase de 12 h, durante cinco dias e analisadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, para a observação das estruturas morfológicas dos fungos, os quais foram identificados ao nível de gênero com o auxílio de bibliografia especializada (BARNET; HUNTER, 1972), determinando-se o percentual de incidência de cada gênero fúngico.

Para o teste de germinação, foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotofase de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos cinco e dez dias conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), sendo avaliadas na primeira contagem as plântulas normais de cada repetição, de onde foram separadas, aleatoriamente, dez plântulas e medido o comprimento de parte aérea e de raiz. Devido ao volume reduzido, as plântulas foram agrupadas em quatro repetições de 20 plântulas para a determinação de massa seca em estufa a 60 °C por 48 h. Aos dez dias de incubação, as plântulas foram classificadas em normais fortes, normais fracas, anormais e sementes mortas e obteve-se o percentual de germinação em cada tratamento de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Foi conduzido um ensaio para avaliação das plântulas em casa de vegetação, com irrigação diária. Foram semeadas quatro repetições de cinco sementes em copos plásticos contendo 30 g de substrato comercial (Carolina Soil®). Foi utilizado o

delineamento inteiramente casualizado, e a avaliação realizada 10 dias após a semeadura. Foram realizadas avaliações de número de folhas, diâmetro do colo, número de plantas com presença de perfilho, comprimento do perfilho, comprimento do sistema radicular, da parte aérea, massa seca do sistema radicular e da parte aérea.

A determinação do índice de velocidade de emergência (IVE) foi realizada em bandejas alveoladas de 200 células, com uma semente por célula, utilizando substrato comercial (Carolina Soil<sup>®</sup>). Foram realizadas contagens diárias das plântulas emergidas até obter-se número constante e assim, determinou-se o índice de velocidade de emergência. Para cada repetição, foi calculado o IVE, somando-se o número de plantas emergidas a cada dia, dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da semeadura, conforme Maguire (1962). Após a emergência tornar-se constante foi determinado o percentual de plântulas emergidas.

A avaliação do desempenho a campo foi realizada no município de Santa Maria (29° 46' 56,03" S; 53° 44' 33,62" O) em solo com principais características minerais descritas na tabela 16. A análise completa encontra-se no anexo 2. A semeadura foi realizada em delineamento blocos ao acaso com quatro repetições. Para cada bloco foram semeadas três linhas espaçadas de 20 cm, sendo as avaliações realizadas na linha central. Foi utilizada bordadura com sementes sem tratamento entre as parcelas, e o espaçamento entre plantas adotado foi de 5 cm. A semeadura foi realizada manualmente, com duas sementes por cova. A adubação foi realizada conforme as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004). Aos 18 dias após a semeadura foi realizada a avaliação de percentual de emergência seguida pelo desbaste, deixando apenas uma planta por cova. Transcorridos 28 dias após a semeadura, foi realizada a determinação da altura das plântulas com auxílio de uma régua milimetrada, e contabilizado o número de folhas por plântulas. As plantas ao apresentarem 50% do florescimento (80 dias após a semeadura), foi coletada a linha central de cada bloco. As plantas foram seccionadas a partir do colo e foi realizada a determinação de massa seca média de planta em estufa a 60 °C, até atingir peso constante.

Para todas as variáveis avaliadas foi calculada a média e realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade de erro, e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de

5% de probabilidade de erro, usando o aplicativo estatístico SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).

**Tabela 16** – Teores de argila, matéria orgânica (MO), pH em água, saturação por bases (V), fósforo extraído pelo método Mehlich-1 (P) e potássio (K), e suas interpretações.

Diagnóstico da fertilidade do solo						
Argila (%)	MO (%)	pH em água	V (%)	Saturação por alumínio (CTC efetiva)	K	P
14	1,1	4,4	7,2	2,2	24	1,5
Textura 4	Baixo	Muito baixo	Muito baixo	baixo	Baixo	Muito baixo

Fonte: CQFS-RS/SC (2004).

### 5.3 Resultados e discussão

#### 5.3.1 – Determinação do potencial hídrico adequado para sementes de aveia preta

A protrusão radicular da primeira semente ocorreu transcorridas 38h de incubação para todos os potenciais testados. O uso do restritor manitol nos diferentes potenciais não influenciou a germinação e a primeira contagem de germinação (Tabela 17). Entretanto, as plântulas originadas dos tratamentos quando acrescido do restritor produziram menor percentual de plântulas anormais. Rossetto et al. (1998), observaram que sementes de beterraba (*Beta vulgaris* L.) submetidas ao condicionamento com água em diferentes tempos, apresentavam maior produtividade. Os tratamentos não diferiram entre si quanto ao percentual de sementes mortas. Apesar de os potenciais não terem diferido entre si, em valores

absolutos, o potencial -0,8 MPa proporcionou o melhor desempenho em todas as variáveis avaliadas.

**Tabela 17** – Médias (%) de plântulas normais aos quatro dias (PN 4d), plântulas normais aos dez dias (PN 10d), sementes mortas (SMO) e plântulas anormais (PAN) de sementes de aveia preta submetidas à diferentes tratamentos.

Tratamentos (MPa)	PN 4d	PN 10d	SMO	PAN
-0,0	28 a*	58 a	9 a	33 a
-0,6	59 a	74 a	18 a	8 b
-0,7	44 a	74 a	9 a	15 b
-0,8	83 a	92 a	2 a	6 b
-0,9	48 a	72 a	36 a	10 b
CV (%)	7	23	8	4

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

### 5.3.2 – Determinação da germinação das sementes antes da aplicação dos tratamentos

Na avaliação inicial da germinação das sementes, o lote apresentou germinação de 88% e primeira contagem de germinação de 73%. Não houve ocorrência de sementes duras, indicando que não havia dormência nas sementes.

### 5.3.3 – Avaliação dos tratamentos

Todos os métodos de microbiolização foram semelhantes quanto à eficiência de colonização por *Trichoderma* spp., alcançando 100% de sementes colonizadas (Tabela 18), demonstrando boa associação com sementes de aveia preta. A eficiência de controle dos patógenos foi variável conforme o método de microbiolização, o organismo utilizado e o gênero do patógeno. Para *Fusarium* sp., o uso das técnicas de condicionamento fisiológico e peliculização potencializaram o efeito de *Trichoderma* spp. Já para *B. subtilis*, a suspensão e o recobrimento das sementes condicionadas proporcionaram o controle. Carvalho et al. (2011) obtiveram controle de até 51% da incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro pelo tratamento com *Trichoderma harzianum*. Entretanto, para a incidência de *Penicillium* sp. apenas a microbiolização com suspensão e o recobrimento das sementes condicionadas na presença de *B. subtilis* não controlaram o fungo. Já para *Aspergillus* sp. todos os tratamentos reduziram significativamente a incidência. Ethur et al. (2006) observaram que o uso de uma formulação pó de *Trichoderma* spp. elevou a incidência de *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em sementes de aveia preta. Isolados de *Bacillus* spp. foram reportados com potencial de controle de escaldadura do arroz (*Gerlachia oryzae*) através da microbiolização de sementes (LUDWIG et al., 2009) e controle de fungos transmitidos pelas sementes de aveia branca (SILVA et al., 2002). A aplicação de *Bacillus subtilis* no solo pode proporcionar ainda, o controle de doenças em parte aérea no decorrer do ciclo da cultura, já que se destaca como indutor de resistência. Nesse sentido, Araujo e Menezes (2009) verificaram o controle de doenças de parte aérea em tomateiro, com eficiência semelhante ao tratamento químico.

*B. subtilis* atuou sobre as sementes de aveia preta provendo a germinação em rolo de papel (Figura 21). Manjula; Podile (2005) obtiveram maior rapidez de germinação em sementes de feijão guandu tratadas com formulação a base de *B. subtilis* AF1 em turfa suplementada com quitina. Entretanto para *Trichoderma* spp., apenas o uso de suspensão de esporos não comprometeu a germinação das sementes, mas todos os tratamentos elevaram o percentual de sementes mortas nos tratamentos com microbiolização do fungo. Utilizando suspensão de esporos

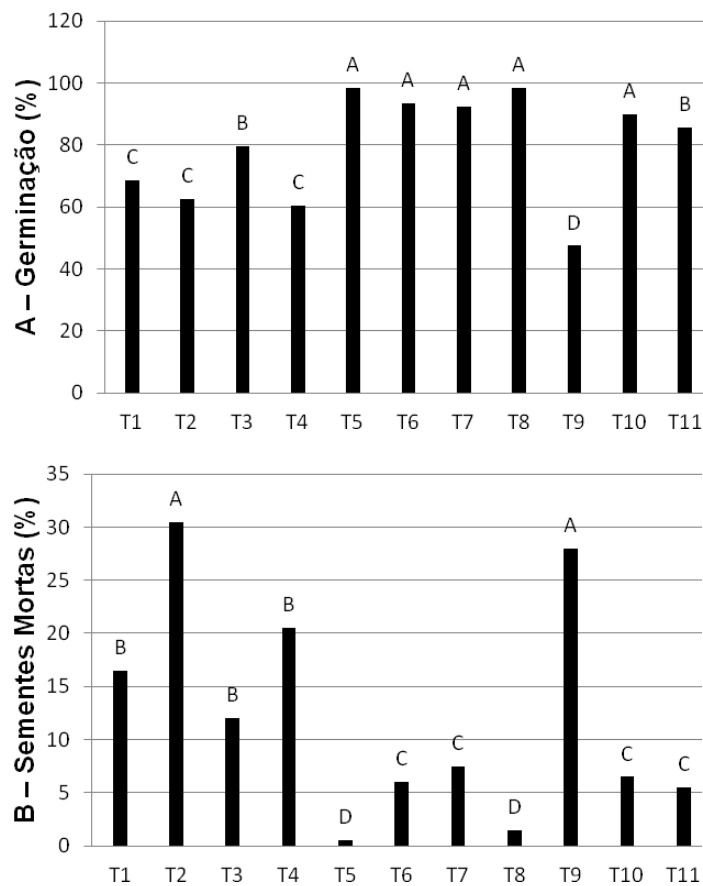


como técnica de microbiolização do mesmo organismo, Carvalho et al. (2011) constataram que não houve prejuízo à germinação de sementes sadias de feijão.

**Tabela 18** – Incidência (%) de *Trichoderma* spp. (TRI), *Fusarium* sp. (FUS), *Penicillium* sp (PEN), *Aspergillus* sp. (ASP) em sementes de aveia preta submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos	TRI	FUS	PEN	ASP
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	100 a*	0 b	1 c	0 d
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	100 a	2 b	1 c	1 d
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	100 a	7 a	0 c	0 d
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	100 a	0 b	0 c	0 d
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	2 c	7 a	17 b	7 c
<i>B. subtilis</i> + peliculização	1 c	6 a	2 c	1 d
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	7 b	0 b	24 a	21 b
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	0 c	0 b	29 a	6 c
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	100 a	0 b	0 c	0 d
Tratamento químico	0 c	6 a	0 c	0 d
Sem tratamento	1 c	9 a	29 a	33 a
CV (%)	7	88	47	66

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 21** – Percentual de germinação (A) e sementes mortas (B) no teste de germinação de sementes de aveia preta submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) germinação: 16,1; sementes mortas: 48,1. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

*B. subtilis* também promoveu maior percentual de plântulas fortes, sendo que o uso das técnicas de condicionamento e peliculização potencializaram o desenvolvimento mais rápido das plântulas na primeira contagem do teste germinação (Tabela 19). Aliado a isso, reduziu o percentual de plântulas fracas e anormais. Em contraponto, *Trichoderma* spp. reduziu a primeira contagem de germinação e o percentual de plântulas fortes, e elevou os percentuais de plântulas fracas e anormais, sendo mais prejudicial pelo o recobrimento das sementes condicionadas (T4 e T9).

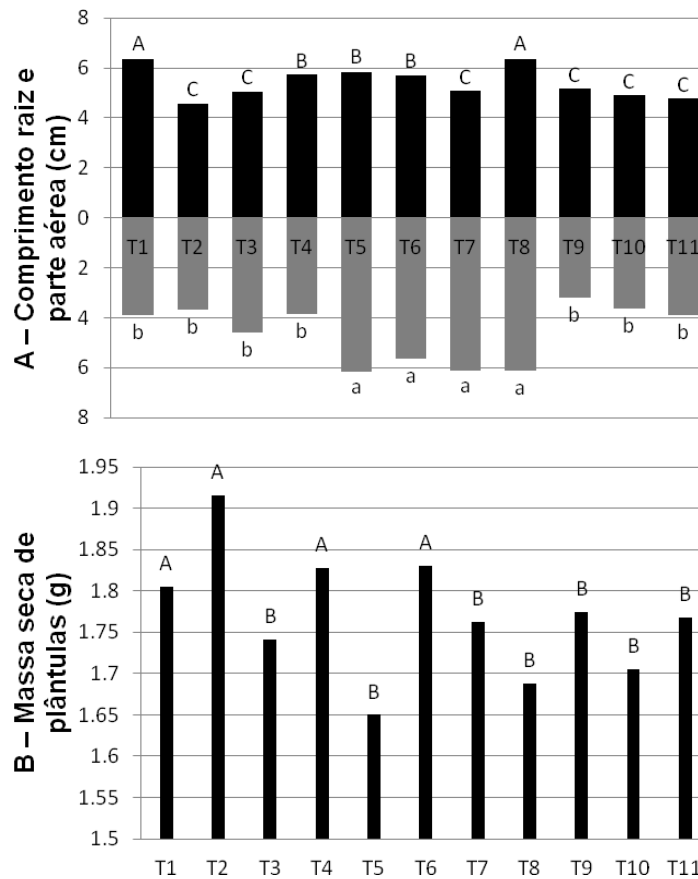
**Tabela 19** – Médias (%) da primeira contagem de germinação (PCO), plântulas fortes (PFO), plântulas fracas (PFR), plântulas anormais (PAN) de sementes de aveia preta submetidas à diferentes tratamentos.

Tratamentos	PCO	PFO	PFR	PAN
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	58 b*	61 c	7 a	15 a
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	56 b	61 c	1 b	7 b
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	73 b	76 b	3 b	8 b
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica + peliculização	35 c	47 d	13 a	19 a
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	88 a	97 a	1 b	1 c
<i>B. subtilis</i> + peliculização	84 a	93 a	0 b	0 c
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	69 b	90 a	2 b	0 c
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	85 a	95 a	3 b	0 c
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	31 c	39 d	8 a	24 a
Tratamento químico	66 b	82 b	8 a	3 b
Sem tratamento	64 b	76 b	9 a	9 b
CV (%)	20	18	71	65

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

*B. subtilis* promoveu maior crescimento do sistema radicular em todas as metodologias utilizadas (Figura 22). Sobre a parte aérea de plântulas, *B. subtilis* e *Trichoderma* spp. foram promotores, entretanto a resposta variou com a técnica utilizada. Para *Trichoderma* spp., o condicionamento isolado teve melhor desempenho, sendo reduzido pelo recobrimento, mas ainda superior às sementes não tratadas. De mesmo modo, Mwangi et al (2011) destacam que *T. harzianum* pode ser usado para aumentar o crescimento de mudas de tomate. Para *B. subtilis*, a utilização de suspensão foi inferior às demais técnicas, sendo o condicionamento seguido pelo recobrimento a de maior destaque. O acúmulo de matéria seca foi intensificado pela adoção de outras técnicas, além da suspensão, para a

microbiolização com *Trichoderma* spp. e pela veiculação pela peliculização de *B. subtilis*.



**Figura 22** – Comprimento (A) e massa seca (B) de plântulas do teste de germinação de sementes de aveia preta submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) comprimento de raiz: 18,7; comprimento de parte aérea: 9,2; massa seca de plântulas: 6,6. Médias com mesma letra maiúscula ou minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

No ensaio conduzido em casa de vegetação, sob condições favoráveis para as plântulas, observou-se que o uso da restrição hídrica para microbiolização com *Trichoderma* reduziu a emergência de plântulas (Tabela 20), sendo que a velocidade de emergência também foi prejudicada por essa forma de tratamento. Faria et al.

(2003), observaram que sementes de algodão tratadas com *T. harzianum* possibilitaram melhorias na germinação, emergência e índice de velocidade de emergência. O diâmetro do colo foi favorecido por *Trichoderma* spp. veiculado pela peliculização e pela associação dos dois organismos com as duas técnicas, com desempenho semelhante ao tratamento químico.

A metodologia de microbiolização utilizada influenciou a ação de *Trichoderma* spp. sobre as plântulas. A metodologia com suspensão ou a restrição hídrica e peliculização isoladas, para este organismo, foram responsáveis por redução significativa no número médio de folhas, no número de plântulas com presença de perfilho, no comprimento do perfilho, comprimento de parte aérea e massa seca de parte aérea (Tabela 20). O recobrimento das sementes condicionadas anulou este efeito deletério. Espécies de *Trichoderma* causaram necrose em raízes de feijoeiro (CARVALHO et al. 2011), Carvalho et al. (2006) relatam a produção de metabólitos tóxicos a coleóptilos de trigo por *T. viride*; Javaid; Ali (2011) constataram ação herbicida de metabólitos de *T. harzianum*, *T. reesei* e *T. pseudokoningii* sobre *Avena fatua*. Entretanto, para *B. subtilis* apenas o recobrimento das sementes condicionadas na presença do organismo implicou em reduções nestas variáveis. O efeito do recobrimento das sementes condicionadas contrastou entre os dois organismos. Para *Trichoderma* spp. foi favorável, anulando o efeito deletério produzido em algumas variáveis, enquanto para *B. subtilis* este foi o tratamento responsável pela redução no desempenho. HÖLBIG et al. (2011) observaram que o uso de películas em ensaios com recobrimento de sementes de cebola hidrocondicionadas prejudicou o vigor das plântulas. Sobre o sistema radicular de plântulas de aveia preta, apenas houve redução do crescimento na utilização da restrição hídrica isolada para o fungo, o que não representou redução na matéria seca de raízes que não diferiu entre os tratamentos.

Em condições de campo, em solo com baixa fertilidade natural, houve efeito significativo dos tratamentos. A emergência foi prejudicada por alguns tratamentos (Figura 23). As técnicas de condicionamento fisiológico e peliculização para *Trichoderma* spp. e a suspensão de células bacterianas para *B. subtilis*, assim como o tratamento químico reduziram a emergência de plântulas. Não houve efeito significativo sobre a altura e número de folhas das plântulas. Entretanto o acúmulo de massa seca em plantas adultas, na época do florescimento, ao ser realizada a dessecação para cobertura de solo, foi favorecido por *Trichoderma* spp., *B. subtilis* e

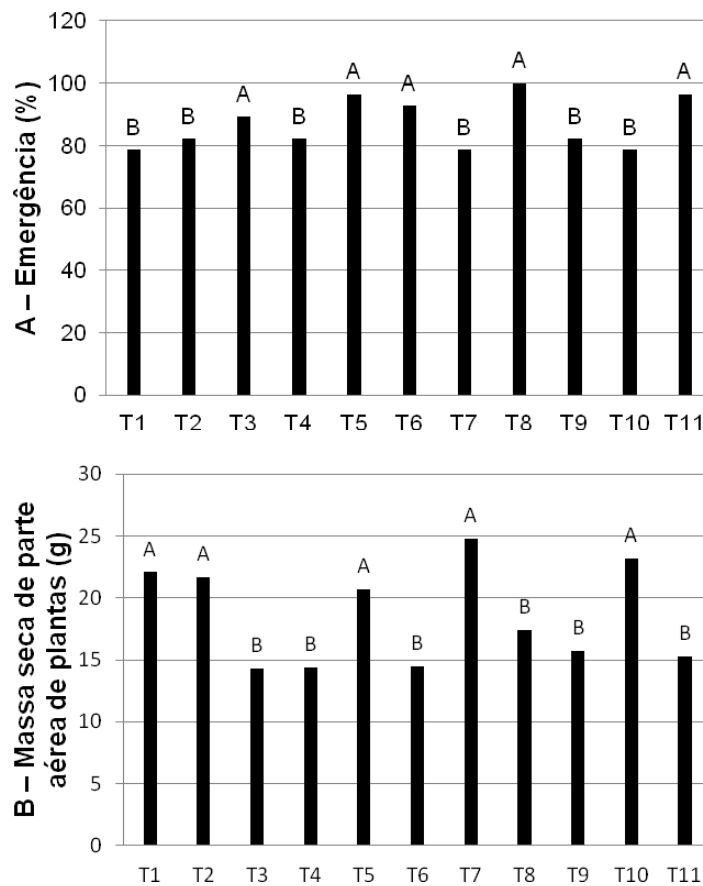
pelo tratamento químico. O condicionamento e a peliculização isolados foram superiores ao uso associado, e à suspensão de esporos para *Trichoderma* spp. Para *B. subtilis*, a microbiolização associada ao condicionamento fisiológico ou pela suspensão tiveram desempenho superior.

A elevação no acúmulo de matéria seca em plantas de aveia preta cultivadas em solo com baixos níveis de fertilidade natural, proporcionada pela microbiolização com *Trichoderma* spp. e *B. subtilis*, representam um aporte importante na produtividade da cultura.

**Tabela 20** – Médias da emergência (EMG), índice de velocidade de emergência (IVE), número médio de folhas (NFO), diâmetro do colo (DCO), número médio de plântulas com presença de perfilhos (PPF), comprimento médio do perfilho (CPF), comprimento de parte aérea de plântulas (CPA), comprimento de raiz (CRA), massa seca de parte aérea (MPA) mensuradas em plântulas cultivadas em casa de vegetação oriundas de sementes de aveia preta sob diferentes tratamentos.

Tratamentos	EMG	IVE	DCO	NFO	PPF
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	83,0 c*	4,4 b	1,8 b	2,3 b	2,2 b
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	97,0 a	5,0 a	2,6 a	2,6 b	1,5 b
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	99,0 a	5,1 a	1,8 b	2,4 b	1,2 b
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica+ peliculização	94,0 a	4,6 b	2,0 b	3,0 a	4,2 a
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	97,0 a	4,8 a	2,0 b	2,9 a	3,5 a
<i>B. subtilis</i> + peliculização	96,0 a	5,1 a	1,9 b	2,8 a	3,7 a
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	98,0 a	4,9 a	2,1 b	2,9 a	4,7 a
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	98,0 a	4,8 a	1,7 b	2,5 b	2,7 b
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	90,0 b	4,5 b	2,3 a	2,8 a	3,5 a
Tratamento químico	100,0 a	4,7 b	2,6 a	2,7 a	3,7 a
Sem tratamento	99,0 a	4,8 a	1,9 b	2,7 a	3,7 a
CV (%)	4,4	5,5	14,5	7,5	35,9
Tratamentos	CPF	CPA	CRA	MPA	
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica	2,2 b*	9,5 b	12,1 b	78,7 b	
<i>Trichoderma</i> spp. + peliculização	1,9 b	10,2 b	15,7 a	87,5 b	
Suspensão de <i>Trichoderma</i> spp.	1,1 b	9,4 b	15,3 a	73,0 b	
<i>Trichoderma</i> spp. + restrição hídrica+ peliculização	3,5 a	13,7 a	16,9 a	113,7 a	
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica	2,9 a	12,5 a	15,7 a	111,7 a	
<i>B. subtilis</i> + peliculização	2,4 b	12,4 a	16,6 a	118,0 a	
Suspensão de <i>B. subtilis</i>	3,7 a	14,4 a	17,9 a	156,5 a	
<i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	1,8 b	9,9 b	16,4 a	89,5 b	
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. subtilis</i> + restrição hídrica + peliculização	4,2 a	12,7 a	15,6 a	114,2 a	
Tratamento químico	2,7 a	12,1 a	18,5 a	114,2 a	
Sem tratamento	3,1 a	12,5 a	17,5 a	132,0 a	
CV (%)	32,8	10,9	9,6	22,3	

\* Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 23** - Percentual de emergência (A) e massa seca de parte aérea (B) de plantas de aveia preta oriundas de sementes submetidas a diferentes tratamentos conduzidas à campo.

Tratamentos: T1: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica; T2: *Trichoderma* spp. + peliculização; T3: Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.; T4: *Trichoderma* spp. + restrição hídrica + peliculização; T5: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica; T6: *Bacillus subtilis* + peliculização; T7: Suspensão de células bacterianas de *Bacillus subtilis*; T8: *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T9: *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* + restrição hídrica + peliculização; T10: Tratamento químico; T11: Sem tratamento. CV(%) emergência: 11,9; massa seca de parte aérea: 33,2. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

## 5.4 Conclusões

- *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* atuam no controle de *Fusarium* sp, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. associados às sementes de aveia preta, tendo resposta variável conforme a técnica utilizada;



- *B. subtilis* promove a germinação de sementes, o desempenho e o crescimento das plântulas, e o acúmulo de matéria seca em plantas de aveia preta, tendo resposta variável conforme a técnica utilizada;
- A microbiolização com *Trichoderma* spp. proporciona crescimento de parte aérea de plântulas e acúmulo de matéria seca em plantas, com resposta variável conforme a técnica utilizada. Entretanto, técnicas como condicionamento fisiológico e peliculização, comprometem a germinação e a emergência de plântulas e a utilização apenas da suspensão de esporos não produz tais malefícios.

## 5.5 Referências bibliográficas

ALTOMARE, C. et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295- 22. **Applied Environmental Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 147-153, 1989.

ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n.9, p. 1633-1643, 1999.

ARAUJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

BAKER, R. Improved *Trichomonas* spp. for promoting crop productive. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 34-38, 1989.

BARNET, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241p.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 398p.

CANTERI, M. G., et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CARVALHO, D.C. et al. Avaliação da capacidade de produzir fitotoxinas *in vitro* por parte de fungos com propriedades antagônicas a nematóides. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1230-1235. 2006.

CARVALHO, D.C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, 2011.

CHET, I.; INBAR, J.; Biological controlo f fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, p. 37-43, 1994.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D.T.; SÖDERSTRÖM, B.(Org.) **The Mycota IV: Evironmental and microbial relationships**. Berlin-Germany: Springer-Verlag, 1997. p.165-184.

COUTINHO, W. M. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

CQFS-RS/SC - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - SC/RS. **Manual de adubação e de calagem para Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 2004. 400p

DEUNER, C.C. et al. Inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão por meio da técnica de condicionamento fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.09-20, 2011.

DINIZ, K. A. et al. 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.

ETHUR et al. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, v.28, n.2, p.17-27, 2006.

FARIA, A. Y. K. et al. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, 2003.

HÖLBIG, L.S. et al. Recobrimento de sementes de cenoura osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.22-28, 2010.

HÖLBIG, L.S.; BAUDET, L.; VILLELA, F.A. Hidrocondicionamento de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.171-176, 2011.

JAVOID, A.; ALI, S. Alternative management of a problematic weed of wheat *Avena fatua* by metabolites of *Trichoderma*. **Chilean Journal Of Agricultural Research**, n.71, v.2, 2011.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Tropicana**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest. Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LUDWIG, J. et al. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaudadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 5, p. 322-328, 2009.

MAGUIRE, J. D. Spread of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MANJULA, K.; PODILE, A.R.. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057-1062, 2005.

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

MARTINS-CORDER, M.P.P.; MELO, I.S. Antagonismo "in vitro" de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, v.55, n.1, p.1-7. 1998.

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

MWANGI, M. W. et al . Inoculation of tomato seedlings with *Trichoderma harzianum* and Arbuscular Mycorrhizal Fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.2, 2011.

ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

ROSSETTO, C. A. V.; MINAMI, K.; NAKAGAWA, J. Efeito do condicionamento fisiológico de sementes de beterraba na emergência e na produtividade. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.2, p.350-355, 1998.

RYU, C.M. et al. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SILVA, R.T.V. et al. Efeito do tratamento de sementes e da profundidade de semeadura no desenvolvimento de plantas de aveia-branca (*Avena sativa* L.) e a microflora da rizosfera e do rizoplano. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 237-243, 2002.

SOUSA, M.V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.41-48, 2008.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista o estudo realizado com técnicas de microbiolização de sementes de milho, feijão, nabo forrageiro e aveia preta com *Trichoderma* spp e *Bacillus subtilis*, pode-se observar que o fungo *Trichoderma* spp. apresenta boa capacidade de associação com as sementes, aumentando assim, a eficiência no controle dos patógenos presentes, independente da espécie vegetal utilizada.

Nas condições do teste de germinação de elevada umidade relativa, condições ambientais favoráveis e falta de uma fonte de carbono alternativa, a associação de *Trichoderma* spp. com as sementes se torna patogênica, pois o fungo utiliza a sementes como fonte de nutrição. Entretanto, quando os testes são conduzidos em substrato ou solo, esses malefícios não são reproduzidos, devido às alterações realizadas no microclima a que as sementes microbiolizadas ficam expostas. Nesse caso, a matéria orgânica do solo serve como fonte de carbono alternativa, assim como os índices de umidade e demais condições ambientais se afastam daquelas favoráveis para o fungo.

A aplicação de *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* via microbiolização de sementes promove o crescimento o desenvolvimento de plântulas e plantas de milho, feijão, nabo forrageiro e aveia preta, tendo resposta variável conforme a técnica de microbiolização adotada.

Tendo em vista as observações realizadas no decorrer das avaliações das diferentes técnicas de microbiolização com os dois organismos, pode-se observar que o tamanho das sementes influencia o efeito da microbiolização sobre a germinação das sementes. Para sementes grandes, como o milho e o feijão, que permanecem 72 horas em contato com o fungo no meio de cultura até que ocorra o início da protrusão da radícula, ocorre prejuízo durante o condicionamento na presença de *Trichoderma* spp. e as sementes foram utilizadas como substrato pelo fungo, comprometendo a sua capacidade germinativa. Nas sementes pequenas, em que o tempo de exposição ao fungo é menor, a resposta depende da espécie vegetal. As demais variáveis avaliadas não apresentam relação com características das sementes, entretanto ensaios conduzidos concomitantemente e nas mesmas condições poderiam corroborar e complementar esta informação.

Em condições de solo com baixa fertilidade natural, as respostas dos tratamentos com microbiolização são mais expressivas. Atribui-se a isso a ação dos organismos sobre o solo, solubilizando nutrientes antes indisponíveis, melhoria na estrutura de agregados do solo, e decomposição da matéria orgânica, aliada a ação direta sobre as plantas, como estímulo ao crescimento e desenvolvimento de raízes e melhor aproveitamento dos nutrientes absorvidos.

# ANEXOS

## Anexo A – Análise de solo

	<b>MEC - Universidade Federal de Santa Maria</b> <b>Centro de Ciências Rurais - Departamento de Solos</b>	
	Santa Maria/RS Cep: 97105-900 Fone/Fax: (55)3220-8153 http://www.ufsm.br/solos <b>Laudo de Análise de Solo</b>	

Nome: MARIO ALOISIO JUNGES  
 Município: TAPERA  
 Localidade: BARRA DO COLORADO

Solicitante: MARIO ALOISIO JUNGES  
 Endereço:  
 Entrada: 25/05/10 Emissão: 16/06/2010

Registro	Cx.	Cel.	Identificação da amostra	Área (ha)	Sistema de cultivo	Prof. (cm)	Georref.
5820 5821	C92 C92	9 10	AMOSTRA A-TOPO AMOSTRA B-BAIXADA				

### Diagnóstico para acidez do solo e calagem

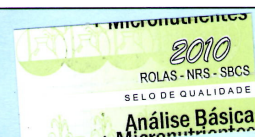
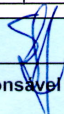
Registro	pH água 1:1	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC efet.	Saturação (%)		Índice SMP
		cmol/dm <sup>3</sup>					Al	Bases	
5820	5,8	5,1	2,6	0,0	3,1	7,8	0	72	6,3
5821	5,7	6,0	2,7	0,0	3,1	9,0	0	74	6,3

### Diagnóstico para macronutrientes e recomendação de adubação NPK-S

Registro	% MO	% Argila	Textura	S	P-Mehlich	P-resina	K	CTC pH7	K
	m/v			mg/dm <sup>3</sup>			cmol/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>	
5820	2,3	48	2	7,0	10,1	--X--	0,14	10,9	56
5821	2,6	36	3	6,0	8,4	--X--	0,27	12,1	104

### Diagnóstico para micronutrientes e relações molares

Registro	Cu	Zn	B	Fe	Mn	Na	Relações Molares		
	ng/dm <sup>3</sup>						Ca/Mg	(Ca+Mg)/K	K/(Ca+Mg) <sup>1/2</sup>
5820	1,8	1,2	0,3	--X--	--X--	--X--	2,0	53,8	0,052
5821	2,4	2,8	0,3	--X--	--X--	--X--	2,2	32,7	0,09

Vinculado à ROLAS-RS/SC		 <b>Responsável Técnico</b>
S		Eng. Agr. Sandro José Giacomini CREA: 100472

## Anexo B – Análise de solo

	<b>MEC - Universidade Federal de Santa Maria</b> <b>Centro de Ciências Rurais - Departamento de Solos</b>	
	Santa Maria/RS Cep: 97105-900 Fone/Fax: (55)3220-8153 http://www.ufsm.br/solos <b>Laudo de Análise de Solo</b>	

Nome: RODRIGO MACHADO  
 Município: SANTA MARIA  
 Localidade:

Solicitante: RODRIGO MACHADO  
 Endereço:  
 Entrada: 02/05/11 Emissão: 12/05/2011

Registro	Cx.	Cel.	Identificação da amostra	Área (ha)	Sistema de cultivo	Prof. (cm)	Georref.
3421	B16	4					

## Diagnóstico para acidez do solo e calagem

Registro	pH água 1:1	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC efet.	Saturação (%)		Índice SMP
		cmol/dm <sup>3</sup>					Al	Bases	
3421	4,4	0,1	0,1	1,9	6,9	2,2	86,4	4,7	5,6


## Diagnóstico para macronutrientes e recomendação de adubação NPK-S

Registro	% MO	% Argila	Textura	S	P-Mehlich	P-resina	K	CTC pH7	K
	m/v			mg/dm <sup>3</sup>			cmol/dm <sup>3</sup>		mg/dm <sup>3</sup>
3421	1,1	14,0	4,0	--X--	1,5	--X--	0,061	7,2	24,0

## Diagnóstico para micronutrientes e relações molares

Registro	Cu	Zn	B	Fe	Mn	Na	Relações Molares		
	mg/dm <sup>3</sup>						Ca/Mg	(Ca+Mg)/K	K/(Ca+Mg) <sup>1/2</sup>
3421	--X--	--X--	--X--	--X--	--X--	--X--	1,1	4,60	0,115

Vinculado à ROLAS-RS/SC  
 S 1ª via

  
 Responsável Técnico

Eng. Agr. Sandro José Giacomin  
 CREA 102472