

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

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E
DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS EM *Paspalum
notatum* Flüge**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Anderson Rossi de Aguiar

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO DE
PLÂNTULAS EM *Paspalum notatum* Flügge**

Anderson Rossi de Aguiar

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

Orientador: Prof. Antonio Carlos Ferreira da Silva

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

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

Aguiar, Anderson Rossi de
Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas
em *Paspalum notatum* Flügge / Anderson Rossi de Aguiar.-
2014.
94 p.; 30cm

Orientador: Antonio Carlos Ferreira da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2014

1. Gramínea nativa 2. Germinação de sementes 3.
Interação planta-microrganismos 4. Sanidade de sementes
5. Índice mitótico I. Silva, Antonio Carlos Ferreira da
II. Título.

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

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

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO DE
PLÂNTULAS EM *Paspalum notatum* Flüggé**

Elaborada por
Anderson Rossi de Aguiar

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre Em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Solange Bosio Tedesco, Dra. (UFSM)

Mauricio Marini Köpp, Dr. (EMBRAPA)

Santa Maria, 11 de Março de 2014.

“Dedico este trabalho a todos que
contribuíram para a sua realização”

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade.

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

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

À professora Solange Bosio Tedesco e ao Dr. Mauricio Marini Köpp, pela Co-Orientação, ajuda e auxílio nas análises estatísticas.

À Dra. Márcia Cristina Teixeira da Silveira e o Dr. João Carlos Pinto Oliveira pela ajuda e auxílio.

As alunas de iniciação científica Daniele, Cândida, Marcela e Jéssica pela ajuda nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório Interação Planta-Microrganismo, Eduardo e Falko pelo convívio e ajuda.

À minha família, em especial a minha noiva Maira, minha mãe Rejane e meu pai Valmir que estiveram sempre ao meu lado.

.

“É belo dar
quando solicitado;
é mais belo,
porém, dar sem
ser solicitado, por
haver apenas
compreendido;
E para os
generosos,
procurar quem
receberá é uma
alegria maior
ainda que a de
dar”.

*Kallil
Gibhran*

RESUMO GERAL

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

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS EM *Paspalum notatum* Flügge

AUTOR: ANDERSON ROSSI DE AGUIAR
ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS FERREIRA DA SILVA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de Março de 2014.

Paspalum notatum, gramínea nativa do bioma Pampa, Rio Grande do Sul, possui alto valor forrageiro, porém apresenta dificuldade de germinação de sementes, com baixa viabilidade. Inseridos neste contexto estão os promotores de germinação e biomassa, bioestimulante Stimulate® e o bioagente *Trichoderma* spp. que através de mecanismos de ação influenciam no metabolismo da espécie. O presente trabalho objetivou estudar a promoção da germinação das sementes e desenvolvimento de *P. notatum*. Através do teste de *Allium cepa* em dez tratamentos (quatro repetições por tratamento), oito com metabólitos de isolados de *Trichoderma* spp. e dois controles na ausência de metabólitos foram selecionados isolados do agente biológico *trichoderma*. O teste da sanidade, a identificação dos fungos associados às sementes utilizaram-se os métodos do papel de filtro e do plaqueamento em meio ágar sólido BDA (batata dextrose ágar). Com a técnica *in vitro* de confrontação direta foi observada a ação do antagonista sobre três fungos contaminantes de maior incidência. Em teste preliminar, selecionou-se o pré-tratamento para a germinação das sementes de *P. notatum*. A germinação das sementes em casa de vegetação constou de 16 tratamentos, com quatro repetições, os tratamentos controle, os três isolados, o stimulate®, a combinação de cada um dos três isolados mais stimulate®, todos com e sem o pré-tratamento, análise dos dados foi através do programa Genes. Para as avaliações das características morfogênicas, foram escolhidos aleatoriamente quatro perfilhos por tratamento, sendo os mesmos monitorados quanto ao aparecimento e alongamento de folhas e senescência. Este monitoramento era realizado duas vezes por semana. Os três melhores isolados de *trichoderma* selecionado no teste de *A. cepa* foram o 2B2, C1, 2B12. A retirada das estruturas de revestimento das sementes de *P. notatum* foi o pré-tratamento que apresentou o melhor desempenho com 34,5% das sementes geminadas. No teste da sanidade foram identificados os gêneros de fungos *Aspergillus*, *Curvularia*, *Geniculosporium* e *Fusarium*, e o isolado 2B2 de *Trichoderma* spp. mostrou eficiente na confrontação direta a estes gêneros de fungos. Para o IVE (índice de velocidade emergência), os tratamentos da combinação do pó biológico do isolado 2B12 de *trichoderma* e o bioestimulante Stimulate® e somente o bioestimulante Stimulate® com pré-tratamento, e sem pré-tratamento a combinação do pó biológico do isolado 2B2 de *trichoderma* com bioestimulante Stimulate®, obtiveram os melhores resultados, com 14.48, 13.93 e 12.75, respectivamente. O bioestimulante stimulate®, promove o índice de velocidade de emergência das sementes de *P. notatum* e a produção de massa seca, a taxa de alongamento inicial da folha (TAIF) interfere positivamente, na massa seca da parte aérea.

Palavras-chaves: Gramíneas nativas. Espécies nativas. Sanidade de sementes. Índice mitótico. Interação planta Microrganismos.

ABSTRACT GENERAL

Master Science Dissertation
Program of Post-Graduation in Agrobiologia
Federal University of Santa Maria

SEED GERMINATING AND SEEDLING DEVELOPMENT *Paspalum notatum* Flügge

AUTOR: ANDERSON ROSSI DE AGUIAR

ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS FERREIRA DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de Março de 2014.

Paspalum notatum, native grass biome Pampa, Rio Grande do Sul, has high forage value, but has difficulty germinating seeds with low viability. Inserted in this context are the promoters of germination and biomass, biostimulants stimulate® and bioagent *Trichoderma* spp. by mechanisms that influence the metabolism of action of the species. The present study investigated the promotion of seed germination and development of *P. notatum*. Through the *Allium cepa* test in ten treatments (four replicates per treatment), eight with metabolites of *Trichoderma* spp. and two controls in the absence of metabolites were selected isolates of trichoderma biological agent. The test of sanity, the identification of fungi associated with seeds used the methods of filter paper and plating on solid agar PDA (potato dextrose agar). With the in vitro technique of direct confrontation of the antagonist action on three fungal contaminants of highest incidence was observed. In a preliminary test, pre-treatment is selected to germination of *P. notatum*. Seed germination in greenhouse consisted of 16 treatments with four replicates, the control treatments, the three isolates, the stimulate®, the combination of each of the three isolates stimulate®, all with and without pretreatment, analysis of the data was through the Genes program. For reviews of morphogenesis, four were randomly chosen tillers per treatment, they monitored for the appearance and elongation and leaf senescence. This monitoring was performed two times per week. The top three trichoderma isolates selected in test *A. cepa* strain were 2B2, C1, 2B12. The removal of the seed coat structures of *P. notatum* was the pre-treatment showed the best performance with 34.5% twinned seeds. In the test of sanity the fungal genera *Aspergillus*, *Curvularia*, and *Fusarium Geniculosporium* were identified, isolated and 2B2 of *Trichoderma* spp. efficient for direct to these fungal genera confrontation. For the IVE (index emergency speed), the combination treatments of biological powder 2B12 isolated from trichoderma and biostimulating Stimulate® and only Stimulate® biostimulating with pretreatment and without pretreatment combination of biological powder isolated 2B2 *Trichoderma* with biostimulating Stimulate®, achieved the best results, with 14.48, 13.93 and 12.75, respectively. The biostimulating stimulate® promotes the rate of speed of emergence of seeds of *P. notatum* and the production of dry matter, the initial rate of elongation of the sheet (TAIF) positively interfere in the dry weight of shoots.

Keywords: Native grasses. Native species. Seed health. Mitotic index. Interaction plant microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Inflorescências de <i>Paspalum notatum</i>	20
Figura 2 – Sementes de <i>Paspalum notatum</i>	20
Figura 3 – Abrangência do Bioma Pampa.....	23

ARTIGO III

Figura 1 - Dinâmica de perfilhamento do <i>Paspalum notatum</i> ao longo de 60 dias de avaliação sob diferentes tratamentos.....	70
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

ARTIGO III

Gráfico 1 – Médias dos percentuais de germinação <i>in vitro</i> das sementes de <i>Paspalum notatum</i>	64
--	----

LISTA DE QUADROS

ARTIGO III

Quadro 1 – Tratamentos constituintes do experimento avaliado o efeito os metabólitos não-voláteis dos isolados de trichoderma e o bioestimulante stimulate® na germinação das sementes de <i>Paspalum notatum</i>	59
Quadro 2 – Tratamentos constituintes do experimento realizado em casa de vegetação onde foi avaliado o efeito de isolados de trichoderma e o bioestimulante stimulate® na emergência de plântulas.....	62
Quadro 3 – Tratamentos constituintes do experimento realizado em casa de vegetação onde foi avaliado o efeito de isolados de trichoderma e o bioestimulante stimulate® na produção massa seca e na análise da morfogênese das plantas de <i>Paspalum notatum</i>	63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1 – Número de células no ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) em pontas de raízes de cebola tratadas com metabólitos produzidos por isolados <i>Trichoderma</i> spp.....	35
Tabela 2 – Índice mitótico de células de pontas de raízes de cebola tratadas com metabólitos produzidos por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	36

ARTIGO II

Tabela 1 – Frequência de fungos (%) associados às sementes de <i>Paspalum notatum</i> detectados em papel de filtro e meio de cultura BDA.....	47
Tabela 2 – Média das notas de antagonismo de isolados de trichoderma a três fungos de maior frequência associados às sementes de <i>Paspalum notatum</i>	50

ARTIGO III

Tabela 1 – Porcentagem de germinação das sementes de <i>Paspalum notatum</i> , submetidas a diferentes Pré-tratamento.....	64
Tabela 2 – Porcentagem de emergência de plântulas de <i>Paspalum notatum</i> com e sem Pré-tratamento.....	65
Tabela 3 – Porcentagem de emergência de plântulas de <i>Paspalum notatum</i> , submetidos a diferentes tratamentos.....	66
Tabela 4 – Índice de velocidade de emergência (IVE) das sementes de <i>Paspalum notatum</i> , submetidos a diferentes tratamentos.....	67
Tabela 5 – Médias da Produção de Massa seca (g.planta ⁻¹) da parte aérea de plantas de <i>Paspalum notatum</i>	68
Tabela 6 – Coeficientes de correlação simples de Pearson entre os caracteres massa seca da parte aérea (MSPA), tamanho final da folha (TFF), taxas de aparecimento (TApF), taxa de alongamento inicial da folha (TAIF), Filocrono, senescência de folhas (TSeF), duração de vida da folha (DVF) e número de folhas vivas por perfilho (NFV).....	69

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Análise da variância para a emergência de plântulas em casa de vegetação.....	88
Apêndice B – Análise da variância Análise da variância para o índice de velocidade de emergência em casa de vegetação.....	88

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Disposição dos tratamentos no experimento: Efeito de metabólitos produzidos por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o índice mitótico nas células das pontas de raízes de <i>Allium cepa</i>	89
Anexo B – Organização das repetições R1, R2, R3, R4.....	89
Anexo C – Fase da divisão celular das pontas de raízes de <i>Allium Cepa</i> em meio contendo metabólitos de <i>Trichoderma</i> spp. (I) Interfase; (II) Prófase; (III) Metáfase; (IV) Anáfase; (V) Telófase.....	90
Anexo D – Método do plaqueamento em meio ágar sólido (I); Método do papel de filtro (II).....	91
Anexo E – Observação das estruturas fúngicas em microscópio óptico e a identificação baseando-se em características morfológicas: (I) <i>Curvularia</i> sp.; (II) <i>Aspergillus</i> sp.; (III) <i>Fusarium</i> sp.; (IV) <i>Geniculosporium</i> sp.....	91
Anexo F – (A) inóculo de isolados de trichoderma na forma de pó biológico; (B) inóculo em envelope de papel seco.....	92
Anexo G – Experimento ex vitro em casa de vegetação. Fase inicial (período de semeadura) (esquerda); Período de emergência de plântula (direita).....	92
Anexo H – Parcela experimental do tratamento controle e tratamento de melhor desempenho (Bioestimulante Stimulate®) (direita).....	93
Anexo I – Desenvolvimento das plântulas de <i>Paspalum notatum</i> 15 dias após a emergência.....	93
Anexo J – Plantas de <i>Paspalum notatum</i> transplantadas em casa de vegetação para análise morfogênica e produção de biomassa (abaixo) Parcela experimental destacando o perfilho avaliado.....	94

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
REVISÃO DE LITERATURA	19
Características gerais da espécie <i>Paspalum notatum</i>	19
Bioma Pampa.....	21
Bioma Pampa: Interações entre Organismos Fitopatogênicos e espécies vegetais nativas.....	23
<i>Trichoderma</i> spp.	24
<i>Trichoderma</i> spp.: Mecanismos de Biocontrole.....	25
<i>Trichoderma</i> spp.: Promoção de crescimento de plantas e germinação sementes.....	26
<i>Trichoderma</i> spp.: Produção de bioformulações.....	27
Bioestimulante stimulate®.....	28
ARTIGO I - Efeito de metabólitos produzidos por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o índice mitótico nas células das pontas de raízes de <i>Allium cepa</i>	30
Introdução.....	31
Material e métodos.....	33
Resultados e discussão.....	34
Conclusão.....	38
Referências.....	39
ARTIGO II - Antagonismo a fungos associados às sementes de <i>Paspalum notatum</i> flügge por trichoderma	42
Introdução.....	44
Material e métodos.....	45
Resultados e discussão.....	47
Conclusão.....	50
Referências.....	52
ARTIGO III - Emergência de plântulas e análise morfogênica de <i>Paspalum notatum</i> Flügge	55
Introdução.....	57
Material e métodos.....	58
Resultados e discussão.....	64
Conclusão.....	71
Referências.....	72
DISCUSSÃO	75
CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
Apêndices.....	88
Anexos.....	89

INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Pampa onde está inserida a espécie estudada *Paspalum notatum*, no sul do Brasil, ocupa cerca de 178.243 km², 63% do território do estado Rio Grande do Sul (HASENACK et al. 2007). Além de estender-se pelo território Uruguaio, Argentino. Mesmo tendo um número expressivo de famílias e gêneros compondo a diversidade dos seus campos, as gramíneas são as mais disseminadas e o gênero *Paspalum* é o de maior destaque (BERRETA, 2001).

Na área de abrangência do bioma Pampa principalmente do Rio Grande do Sul, o interesse no cultivo de espécies forrageiras ocorre em razão da importância que a pecuária tem para a economia. A escolha da espécie para compor a pastagem dos campos sulinos é devida esta apresentar bons níveis de produção de biomassa e nutricionais. Dentre outras, algumas se destacam como no caso do *P. notatum* uma das nativas mais utilizadas para alimentação animal, pela alta produção de forragem e bom valor nutritivo (COSTA, 1997). No Rio Grande do Sul os genótipos de *P. notatum* para produção de matéria seca apresentam expressivos valores, próximos a 14.000 - 15.000 kg de MST/ha (STEINER, 2005).

Mesmo com alto índice de produção de biomassa e boa qualidade, *P. notatum* apresenta dificuldade de germinação, por este motivo sofre com a baixa viabilidade das sementes, e o menor aproveitamento (MAEDA et al., 1997). Por consequência, os promotores de germinação e desenvolvimento de biomassa são inseridos neste contexto.

O bioestimulante atua sobre o metabolismo vegetal e pode ser utilizado nas fases iniciais da cultura, estimulando emergência e o desenvolvimento das plantas. Essas substâncias estão envolvidas nos processos fisiológicos da germinação, que controlam o metabolismo e as respostas das sementes ao ambiente (BOTELHO, 2001).

As respostas para a promoção de germinação de sementes por isolados de trichoderma (*Trichoderma* spp.) estão relacionadas à assimilação de nutrientes e desenvolvimento mais vigoroso das raízes, secreção de fitohormônios reguladores de crescimento, aumento da concentração de nutrientes e minerais do solo através da atividade saprofítica. Espécies de trichoderma também agem através da competição, parasitismo direto, produção de metabólitos secundários e por serem

parasitas de estruturas de resistência de patógenos no ambiente (MELO, 1998).

Além da ação benéfica do bioestimulante e do agente biológico trichoderma, na promoção da germinação, a associação de microrganismos fitopatogênicos às sementes causam efeitos negativos à qualidade fisiológica das sementes, afetando vigor e a emergência (PREVIERO et al., 1999). A ocorrência de tais fitopatógenos pode causar dificuldades na propagação das espécies nativas de vários biomas, as quais não estão adaptadas e não desenvolvem mecanismos de defesa na interação com estes microrganismos.

Pesquisas com interação gramíneas-fungos e bioestimulantes são escassas em relação ao aumento do poder germinativo de sementes. Trabalhos relacionados a espécie *P. notatum*, o bioestimulante Stimulate® e *Trichoderma* spp. poderão gerar alternativas viáveis para a promoção da germinação de sementes e biomassa da gramínea grama forquilha.

O Estudo da promoção da divisão celular de *Allium cepa in vitro* por metabólitos de trichoderma permite a determinação dos índices mitóticos como um modelo vegetal “*in vivo*”, para a seleção de agentes biológicos promotores de germinação e desenvolvimento vegetativo. A análise da sanidade de sementes de *P. notatum in vitro* e o estudo de antagonismo, utilizando metabólitos de diferentes isolados de trichoderma; bem como a identificação dos gêneros de fungos presentes nas sementes, possibilita medidas prévias visando o controle dos danos causados por fungos. A promoção da germinação de sementes e desenvolvimento de *P. notatum* em casa de vegetação permite a observação da ação dos isolados de trichoderma e do bioestimulante Stimulate®, na germinação de sementes. Os componentes do crescimento das plantas forrageiras e suas relações com fatores ambientais são analisados através da morfogênese da planta, por meio de uma abordagem ecofisiológica (CHAPMAN & LEMAIRE, 1993), além de mensurar a produção de biomassa através dos diferentes tratamentos.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a germinação de sementes e desenvolvimento de *P. notatum* em interação com trichoderma e ou bioestimulante Stimulate®.

REVISÃO DE LITERATURA

Características gerais da espécie *Paspalum notatum*

Paspalum notatum, família Gramineae (Poaceae), subfamília Panicoideae e Tribo Paniceae (HEYWOOD, 1985), pertencente ao gênero *Paspalum*, que nas gramíneas nativas, se destaca com um grande número de espécies (VALLS, 1987).

O centro de origem e variabilidade genética localiza-se na região sul da América do Sul (BATISTA, 1998), das 400 espécies, 130 estão no Brasil (VALLS, 2005). As espécies e os ecótipos estão distribuídos nas regiões Centro-Sul do Brasil, Leste da Bolívia, Norte da Argentina, Paraguai e Uruguai (BATISTA, 1998). Pizarro (2000) relata que estudos relacionados ao manejo e produção de sementes do gênero *Paspalum*, são escassos e dificultam a comercialização. Importante economicamente para a forragicultura, considerada uma das principais forrageiras para alimentação animal, por produzir bons níveis de biomassa em quantidade e qualidade (FRANKE & NABINGER, 1996). No combate à erosão, como cobertura perene para a conservação do solo, sendo utilizada em terrenos acidentados, devido à produção elevada de raízes e rizomas (ESPINDOLA, 1998). Pela beleza e uniformidade do gramado que forma é muito usada para fins ornamentais (MAEDA, 1997). Segundo Valls & Pozzobon (1987), os ecótipos de *P. notatum* presentes no Rio Grande do Sul são caracterizados por serem Apomíticos e tetraplóides macho-férteis que podem ser utilizados como genitores masculinos em cruzamentos (Dahmer et al. 2008). São encontrados alguns biotipos no Norte do País, onde a característica marcante é possuírem folhas mais largas. Conforme Barreto (1974), 20 a 40 % da cobertura herbácea das pastagens naturais do Rio Grande do Sul são compostas por *Paspalum notatum*.

As suas sementes apresentam dificuldades de germinação, em razão de possuírem dormência, caracterizada pela impermeabilidade a trocas gasosas do interior da semente com o meio exterior (ANDRADE E VAUGHAN, 1980). Conforme Popinigis (1977) a causa da dormência em *Paspalum notatum* é a rigidez mecânica imposta através de sua cariopse, de tal forma capaz de impedir o crescimento do embrião.

A espécie *Paspalum notatum* possui folhas com bainha glabra; lígula com anel de pêlos curtos e hialinos; lâmina lanceolada, de ápice acuminado, glabra, de coloração verde-viva na face superior e pálida na inferior (MAEDA, 1997). As plantas são herbáceas, com colmo comprimido, achatado, perenes, estival, rizomas supraterrâneos de entrenós curtos, com lâminas foliares com ápice agudo e nervuras pouco marcadas (WANDERLEY et al., 2001). Dois rácermos de 2,5 a 12cm de comprimento, espiciformes opostos surgem na parte superior das hastes florais. Raques com cerca de 1 mm de espessura, espiguetas, em duas fileiras, com 2,5-2,8mm de comprimento, por sua vez, as glumas e glumelas possuem a coloração verdes, glabras (MAEDA, 1997). As cariopses de *Paspalum notatum* são ovóides com 2,0-3,5mm de comprimento por 1,5-2,5mm de largura, comprimidas nas duas faces, de coloração branco-amarelada. Essas unidades são protegidas pelo lema e mais internamente pela pálea, e externamente pela gluma (SHIPPINDALL et al., 1955).



Figura 1: Inflorescências de *Paspalum notatum*.



Figura 2: Sementes de *Paspalum notatum*.

Fonte: (1) www.google.com; própria do autor.

Bioma Pampa

O bioma Pampa se estende em 178.243 km², 63% do território do estado do Rio Grande do Sul e a 2,07% do território brasileiro (HASENACK et al. 2007). Abrange o Uruguai, Nordeste da Argentina, Sul do Brasil.

A ocupação predominantemente de espécies herbácea, onde se encontram diversas famílias, entre elas Poaceae, Asteraceae, Cyperaceae, Fabaceae, Rubiaceae, Apiaceae e Verbenaceae (BRASIL, 2000). Porém, as gramíneas compõem grande parte da vegetação, que permite a manutenção de um nível alto de carga animal, no total de 65 milhões são mantidos (BERRETA, 2001). Conforme Santos (2012) o bioma Pampa se caracteriza por apresentar diversidade estrutural e funcional, com uma numerosa coleção de espécies. Entre os gêneros, *Paspalum* se destaca e nas espécies o *P. notatum*, estando presente em diversos ambientes, e possuindo vários biótipos adaptados a diferentes condições de meio. Segundo Boldrini et al. (2010) há mais de 2.200 espécies campestres em todo o território do bioma Pampa.

Conforme Burkart (1975) a abundância da diversidade florística do bioma Pampa, revela uma herança genética significativa. A vegetação campestre, denominada campos, está incluída em dois biomas segundo a classificação do IBGE (2004) no bioma Pampa, metade sul do RS, e Mata Atlântica (OVERBECK et al., 2009), na metade norte do Estado.

Boldrini et al. (2010) classificam os campos do bioma Pampa do Rio Grande do Sul em sete unidades, campos de barba de bode, campos de solos rasos, campos de solos profundos, campos dos areais, vegetação savanóide, campos do centro do Estado e campos litorâneos.

Essa grande diversidade biológica dos campos do RS se deve, em especial, à diversidade de solos procedentes da grande variabilidade geológica, topográfica, pluviométrica, térmica e de disponibilidade hídrica (BOLDRINI et al., 2010).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE, 2006), entre 1970 e 1996 ocorreu uma perda de 3,5 milhões de ha na superfície das pastagens naturais.

A divisão em unidades fitofisionômicas no bioma de Pampa ocorre em função da estrutura e composição de espécies, cada uma das unidades tem grupos de espécies específicos, caracterizando assim sua fisionomia (BOLDRINI et al., 2010).

Nimer (1977) destaca que o clima predominante é mesotérmico brando superúmido, com invernos frios. As temperaturas chegam a 0°C no inverno, enquanto no verão a variação é de 22°C a 24°C, podendo chegar a 30°C (SUERTEGARAY, 1998).

A microbiota rizosférica nesse bioma estabelece o desenvolvimento da vegetação na relação direta com as plantas (CHAER E TÓTOLA, 2007). Uma problemática para a vegetação que compõem o bioma Pampa é a estrutura do solo, que na sua maioria é arenoso, isto leva conseqüentemente, a vulnerabilidade das espécies nativas que habitam o ambiente. Isto foi resultado, da ação do manejo do solo inadequado, em áreas de criação de animais (ROESCH *et al.*, 2009). A ação do homem alterou em 49% a área do bioma, restando ainda 41% de vegetação nativa em diferentes estados de conservação, além da área ocupada pelos corpos d'água, que corresponde a 10% (HASENACK, 2007).

Na abrangência territorial do bioma Pampa, a degradação explica-se através de práticas agrícolas desenvolvidas na região em que está inserido. A pecuária era a principal atividade até a introdução das monoculturas de trigo e soja (VERDUM, 2006), ambas as práticas utilizavam manejos não conservacionistas, com a soma do efeito do clima, o esgotamento do ambiente e a degradação foram inevitáveis. Ainda, outro fator relatado, são os investimentos estrangeiros na inserção de monoculturas de espécies exóticas no bioma Pampa, com uma ilusória “solução para os problemas ambientais por tratar-se de plantio de árvores” (FIGUEIRÓ e SELL, 2010).

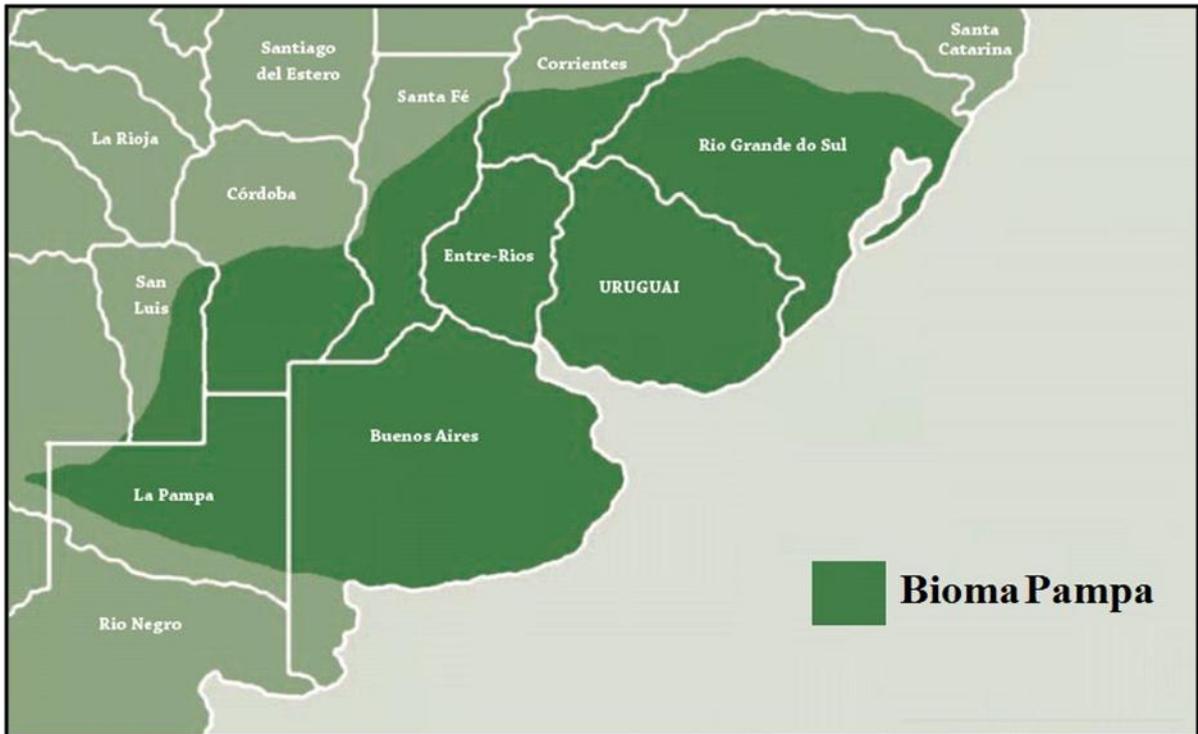


Figura 3: Abrangência do Bioma Pampa.

Fonte: (Modificado) Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade / Valério De Patta Pillar... [et al.]. Editores. – Brasília: MMA, 2009.

Bioma Pampa: Interações entre Organismos Fitopatogênicos e espécies vegetais nativas

A incidência desses organismos pode estar associada à plântula no período inicial de emergência e à semente (DHINGRA et al., 1980). Assim, o monitoramento e controle de organismos fitopatogênicos são imprescindíveis para manter o equilíbrio de ecossistemas presentes no bioma Pampa, caracterizados por grande variedade de famílias e gêneros de plantas nativas.

Muniz et al. (2007) relatam que o gênero *Mimosa* presente neste bioma, apresentou, em testes realizados com suas sementes, a presença de *Alternaria* sp. e *Aspergillus* sp., organismos patogênicos, com possíveis efeitos deletérios ao desenvolvimento das espécies desse gênero. Conforme Bittencourt e Homechin (1998), os dois gêneros citados também são observados em sementes de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.) espécie nativa do bioma Pampa (SARMENTO E VILLELA, 2010), bem como o gênero *Cladosporium* que, presente em nativas, pode causar podridão nas sementes ainda no solo. Segundo Oliveira (2011), os

fungos *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram observados colonizando as sementes de *Eugenia uniflora* L. espécie nativa do bioma. Avila et al. (2009) também encontraram *Cladosporium* sp. e *Alternaria* sp. com altas incidências ao longo da maturação dos frutos e sementes de *E. uniflora*, e baixas incidências de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., fungos patogênicos em sementes.

Os microrganismos patogênicos podem interagir com plantas específicas, e animais, numa grande variedade de microhabitats (CLERGUE et al., 2005; MARRIOTT et al., 2004). No norte da Argentina, parte do bioma Pampa, a substituição de campos nativos por cultivos anuais modificou o padrão de distribuição de microrganismos (DAILY E EHRLICH, 1996; POLOP et al., 2007), causando efeitos deletérios para o ambiente. Os efeitos de organismos fitopatogênicos são citados por recentes avaliações da situação das espécies ameaçadas de extinção em escala nacional e regional como uma das principais ameaças sobre a fauna dos Campos Sulinos (FONTANA et al., 2003, MIKICH E BÉRNILS, 2004, MACHADO et al., 2008).

A presença de fitopatógenos pode ocasionar a supressão de espécies de plantas nativas no bioma Pampa, acelerando o processo de desertificação em áreas degradadas.

***Trichoderma* spp.**

Trichoderma spp. é um dos microrganismos mais estudados como bioagente promotor de desenvolvimento vegetativo, germinativo e no biocontrole de organismos fitopatogênicos (ALTOMARE et al. 1999). Vive de forma saprofítica, ou na interação com outros fungos parasitando-os (MELO, 1998). Conforme Harman (2004) são classificadas como deuteromycotina, não possuindo em alguns casos, ciclo sexual definido. São organismos de vida livre, observados predominantes da microbiota do solo, no sistema radicular de plantas e em materiais em decomposição (SAMUELS, 2006). Segundo Carvajal (2009), o potencial deste microrganismo é visível em culturas agrícolas, quando há a inoculação com *Trichoderma* spp. em relação a produtividade e crescimento das plantas, em espécies como ervilha, tomate, alface, cenoura, milho, algodão, feijão, e ornamentais como o crisântemo.

A característica da eficiência na propagação que o gênero possui esta ligada a capacidade de sintetizar e secretar enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários, além de ser um agente decompositor de matéria orgânica, relacionado a algumas espécies (CARRERAS-VILLASEÑOR, SÁNCHEZ-ARREGUÍN *et al.*, 2012). Outro aspecto positivo é o processo de colonização de diversos habitats, isto se deve pelo fato do *Trichoderma* spp. responder rapidamente aos variados estímulos do ambiente, como a luminosidade, temperatura, entre outros (CARRERAS-VILLASEÑOR, SÁNCHEZ-ARREGUÍN *et al.*, 2012).

***Trichoderma* spp.: Mecanismos de Biocontrole**

As Espécies de trichoderma desenvolvem mecanismo de biocontrole através de interações físicas e pela produção de metabolitos, assim são apontadas como antagonistas efetivos contra vários gêneros de fungos fitopatogênicos, consequência pela síntese de metabólitos voláteis e não voláteis (CLAYDON *et al.*, 1987) como também pelo hiperparasitismo (PAPAVIZAS, 1985) e pela competição por nutrientes, espaço e oxigênio (CHET & ELAD, 1983). O primeiro relato sobre a produção de metabólitos tóxicos por espécies de trichoderma ocorreu por Weindling (1934), que observou haver difusão do princípio letal em hifas jovens. A produção de exoglucanases e endoglucanases, celobiase e quitinase, realizado por *Trichoderma* spp. confere o potencial de degradar a parede celular de fungos fitopatogênicos (RIDOUT *et al.*, 1988).

***Trichoderma* spp.: Promoção de crescimento de plantas e germinação de sementes**

A promoção de crescimento e germinação de plantas realizada por isolados de *Trichoderma* spp. foi inicialmente relacionado ao controle de microrganismos patógenos presentes no solo. A produção de hormônios é um dos fatores relacionados também; bem como, a maior utilização no uso de nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção pela planta (LUCON, 2009).

A capacidade de colonizar as raízes é uma das interferências de *Trichoderma* spp. no crescimento de plantas e no aumento da produtividade (ETHUR, 2006). Algumas linhagens de *Trichoderma* spp. podem ter efeito estimulatório no

crescimento e no florescimento de plantas hortícolas (BAKER, 1989). Em solos autoclavados pode vir a aumentar a emergência e matéria seca de plântulas de tomate e fumo (WINDHAM et al., 1986).

Em estudos utilizando *Arabidopsis thaliana* a auxina sintetizada de *Trichoderma* spp. resultou no equilíbrio do crescimento e desenvolvimento da planta, através da inoculação de *Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride* desenvolvendo interação entre fungo-planta, resultando em características fenotípicas relacionadas com a auxina, como o aumento da produção de biomassa (CARVAJAL et al, 2009).

Assim, a ação do trichoderma como biopromotor é realizada por uma variada produção de enzimas e fatores bioquímicos, além do controle de microrganismos fitopatogênicos (BAUGH; ESCOBAR, 2007).

A utilização de trichoderma, em relação à germinação resulta na promoção da porcentagem e a precocidade, Além de estimular o aumento na altura de plantas, e o desenvolvimento das raízes laterais (MELO, 1996). Conforme Kleifeld e Chet (1992) isolados de *T. harzianum* proporcionam benefícios aplicados, como tratamento de semente e de solo na germinação de feijão, rabanete, tomate e pepino. Esta mesma espécie de trichoderma associado a *Pseudomonas* aumentou a germinação de sementes de tomate (SRIVASTAVA et al., 2010). Em solos não manipulados, ou seja, naturais, isolados de *Trichoderma* spp. proporcionam a promoção de germinação de sementes, emergência e vigor de plântulas de berinjela (MARTINCORDER & MELO, 1997). Nas Sementes de algodão submetidas aos tratamentos com *T. harzianum*, carboxin+thiram e carbendazin+thiram apresentaram porcentagem de germinação superior à testemunha (FARIA et al., 2003). Conforme Machado et al. (2012) diversos trabalhos vêm sendo realizados visando promover a germinação, o crescimento e a produtividade de diversas culturas.

***Trichoderma* spp.: Produção de bioformulações.**

O gênero trichoderma em razão do seu potencial para a área industrial e biotecnológica é um dos fungos mais trabalhados (SAMUELS, 1996). Conforme Machado et al. (2012) a produção de bioformulações envolve um alto nível de pesquisa e tecnologia com potencialidade para enquadrar-se no mercado

agroindustrial. Assim, é de grande importância o conhecimento das demandas fisiológicas do trichoderma e a realização de testes que indiquem os componentes necessários para sua formulação do bioproduto.

A fermentação sólida ou semi-sólida e o processo bifásico na produção de fungos são os mais utilizados, que envolvem as etapas de fermentação líquida e sólida. A produção de inóculo deve seguir condições assépticas em laboratório, este fator sendo fundamento para o desenvolvimento de mecanismo de biocontrole (MACHADO et al., 2012). No cultivo de fungos, que utiliza o uso de substratos sólidos, como os grãos de cereais há vantagem de serem biodegradáveis (Fortes et al., 2007), contudo, pode vir a ter problemas de conservação.

Segundo Machado et al. (2012) para o desenvolvimento de uma nova formulação não existe uma simples combinação de inertes a determinado ingrediente ativo. O relevante neste processo complexo são aspectos relacionados com as características do propágulo utilizado como ingrediente ativo, características do sistema produtivo, características físicas e químicas dos inertes, compatibilidade dos compostos da formulação ao microrganismo, estabilidade do ingrediente ativo no armazenamento, efeito no desempenho ou atividade do formulado sobre o alvo em relação ao microrganismo não formulado.

Bioestimulante stimulate®

Os bioreguladores são compostos orgânicos, classificados como naturais ou sintéticos, que as plantas não têm capacidade de produzir (LUZ, 2013). De acordo com CASTRO e VIEIRA (2001), o bioestimulante ou bioestimulante vegetal tem origem da combinação de dois ou mais biorreguladores com outras substâncias (aminoácidos, nutrientes, vitaminas). Atua de forma equivalente ao dos hormônios vegetais, Regulando o crescimento dos órgãos das plantas (SANTOS, 2004), e a expressão do potencial genético das plantas, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular (ONO et al., 1999). Influência em diversos processos como germinação, floração, frutificação e senescência, na aplicação em sementes e folhas (CASTRO & MELOTO, 1989).

O bioestimulante Stimulate® é composto por uma combinação de hormônios, o ácido indolbutírico a 0,005%; citocinina a 0,009%; e ácido giberélico a 0,005%.

Segundo Castro et al.(1998) é um produto com fitorreguladores. A citocinina está relacionada diretamente ao crescimento das plantas, e a multiplicação celular. O ácido giberélico apresenta efeitos no desenvolvimento de órgãos vegetativos, promove a germinação de sementes, e induz a formação de flores masculinas e femininas (DAVIES, 1987). O ácido indolbutírico participa do crescimento e do desenvolvimento vegetativo.

O bioestimulante Stimulate® demonstrou nas culturas do feijão e milho que estimula a germinação de sementes (VIEIRA, 2001). Castro et al. (1998) observaram efeitos significativos do Stimulate®, nas culturas da laranja pera e do arroz. Bertolin (2010) relata que a utilização de Stimulate® na cultura da soja resulta em aumento na produtividade total. No feijoeiro, demonstraram que, o emprego do Stimulate® nas fases fisiológicas R5 e R7, possibilitou elevação significativa na produtividade, em três experimentos independentemente do cultivo utilizado (convencional ou direto) (COBUCCI et al. 2005). Em outro experimento realizado com alfafa em casa de vegetação durante período de inverno, a aplicação de o ácido giberélico a 5 mg.L^{-1} , componente do Stimulate® aplicado uma semana após o corte da alfafa, promoveu o aumento da massa seca da parte aérea da planta (CAMARGO, 1992).

Os hormônios auxina, giberelina, citocinina, etileno e ácido abscísico estão envolvidos no desenvolvimento vegetativo das plantas, além deles, os hormônios vegetais esteroides e os brassinoesteróides, possuem a capacidade de interferir nos aspectos morfológicos e no próprio desenvolvimento vegetativo (TAIZ E ZEIGER, 2004). A planta pode sintetizar os hormônios em diferentes partes, as auxinas são produzidas em ápices de caule, ramos, raízes e transportado para outras regiões da planta, responsável pela formação das raízes, vascularização, e desenvolvimento de frutos (HOPKINS, 1999). Taiz e Zeiger (2004) enfatizam que as auxinas estimulam a divisão celular, conseqüentemente o crescimento dos órgãos vegetativos como folhas e caules e a diferenciação de raízes em cultura de tecidos. Na interação com as espécies vegetais, um dos hormônios de maior destaque a giberelina, participa intensamente dos mecanismos bioquímicos. Este hormônio foi descoberta por ocorrência de uma anormalidade estudada, apresentada por algumas plantas na cultura do arroz, denominada doença das plantas “loucas”, no Japão no início do século (STOWE E YAMAKI, 1957). A citocinina grupo hormonal que também atua no desenvolvimento de plantas, apresenta a habilidade para promover o índice mitótico em culturas de tecido, junto com as auxinas (DAVIES, 1987). Em plantas a

biossíntese das citocininas, acontece nas raízes e em sementes, o transporte ocorre através do xilema, e das raízes para a parte aérea. Segundo Nagao e Rubenstein (1975), a aplicação de citocininas em combinação com a técnica de decapitação das plantas de ervilha aceleraram as brotações laterais. A aplicação de citocinina em gemas laterais leva o seu crescimento, mesmo com a presença da auxina, modificando a dominância apical (RAVEN, 2001).

Sistema teste de *Allium cepa*

O sistema teste de *Allium cepa* serve para estudos com agentes biológicos, que afetam o potencial Citogenético de organismos (FACHINETTO et al., 2007). O índice mitótico é utilizado como o indicador de proliferação adequada das células (GADANO et al., 2002). Com isso, a análise da taxa de divisão celular e aberrações cromossômicas, indicadores de anormalidades no DNA, tornam-se parâmetros microscópicos (MONARCA et al., 2000).

El Shahaby et al. (2003), consideraram o sistema teste de *Allium cepa* o mais adequado para a relação de toxicidade/genotoxicidade na avaliação de níveis de poluição ambiental. Camparoto et al. (2002), utilizando as células de *Allium cepa* obtiveram resultados significativos de infusões de *Maytenus ilicifolia*, *Bauhinia candicans*. Bagatini et al. (2007), concluíram que o sistema teste vegetal de *Allium cepa* apresenta-se como um bioindicador ideal para análise da genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade.

O teste vegetal de *Allium cepa* tem sido validado internacionalmente como um promissor bioindicador vegetal, sendo utilizado como teste preliminar para avaliar o potencial de substâncias cancerígenas (BARBÉRIO et al., 2009).

ARTIGO I

Efeito de metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. sobre o índice mitótico nas células das pontas de raízes de *Allium cepa*.

RESUMO

Microrganismos do solo produzem metabólitos importantes para a produção de compostos biologicamente ativos. Dentre estes microrganismos, as espécies de trichoderma (*Trichoderma* spp.) possuem a capacidade de produzir metabólitos. A promoção do desenvolvimento de plantas por trichoderma pode estar relacionada, entre outros fatores, ao estímulo a multiplicação celular, através da produção de hormônios, entre outros. O método de avaliação das alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ*. O objetivo do estudo foi selecionar isolados do agente biológico trichoderma que promovam, através de seus metabólitos, o aumento do índice mitótico em células de pontas de raízes pelo sistema teste de *Allium cepa*. Foram utilizados isolados de trichoderma das espécies *Trichoderma harzianum* (2B2, 2B22, 2B12); *Trichoderma viride* (TSM1, TSM2, C1) e os bioprodutos comerciais Agrotrich® e Trichodermil®. Os bulbos de *Allium cepa* foram arranjados em dez tratamentos (quatro repetições por tratamento), oito com metabólitos de isolados de *Trichoderma* spp. e dois controles na ausência de metabólitos. A contagem das células ocorreu na região meristemática, onde foram contadas 500 células por bulbo em cada uma das lâminas. Foram observadas as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, com auxílio de microscópio ótico com a objetiva de 40X. Foram calculados os valores médios do número de células de cada uma das fases do ciclo celular estudadas, após calculou-se os índices mitóticos. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste χ^2 (Qui-quadrado), com probabilidade de 5%, pelo programa estatístico BioEstat 4.0. Os tratamentos T1, T3 e T4 (metabólitos dos isolados 2B2, 2B12 e C1 de trichoderma, respectivamente) apresentaram os maiores números de células para as fases prófase, metáfase, anáfase e telófase e alcançaram os maiores IM ($\chi^2= 5.45$ $\alpha= 0.05$), ($\chi^2= 5.0$ $\alpha= 0.05$) e ($\chi^2= 3.92$ $\alpha= 0.05$), respectivamente. O tratamento controle T10 (meio líquido BD), apresentou o maior número de células em interfase, e o menor nas fases da divisão celular. O teste com raízes de *Allium cepa* possibilita selecionar isolados de trichoderma que induzem o aumento do índice mitótico em pontas de raízes pela ação de metabólitos e apresenta variabilidade entre os isolados estudados.

Palavras chaves: *Allium cepa*. Divisão celular. Microrganismos. Teste vegetal. *Trichoderma* spp.

ABSTRACT

Effect of metabolites produced by *Trichoderma* spp. on mitotic cells of root tips of *Allium cepa*.

Soil microorganisms produce metabolites important for the production of biologically active compounds. In relation to these organisms, species of *Trichoderma* (*Trichoderma* spp.) have the ability to produce metabolites. Promoting the development of plants by trichoderma may be related, among other factors, to stimulate cell proliferation through the production of hormones, among others. The evaluation method of chromosomal abnormalities in *Allium cepa* roots is validated by the International Programme on Chemical Safety (IPCS, WHO) and United Nations Environment Programme (UNEP) as an effective test for in situ analysis and monitoring. The aim of the study was to select biological agent *Trichoderma* isolates that promote, through its metabolites, increased mitotic index in cells of the root tips of *Allium cepa* test system. Were used *Trichoderma* species isolated from *Trichoderma harzianum* (2B2, 2B22, 2B12), *Trichoderma viride* (TSM1, TSM2, C1) and bioproducts business Agrotich® and Trichodermil®. The bulbs of *Allium cepa* were arranged in ten treatment (four replicates per treatment), eight with metabolite of *Trichoderma* spp. and two controls in the absence of metabolites. Cell counts occurred on the meristematic region where 500 cells were counted for each bulb on the blades. Cells were observed in interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase, with the aid of an optical microscope with a 40X objective. Values were calculated from the average number of cells in each phase of the cell cycle analyzed after it was calculated mitotic rates. Statistical analysis of data was performed by χ^2 test (chi-square), with a probability of 5%, the statistical program BioEstat 4.0. Treatments T1, T3 and T4 (metabolites of isolates 2B2, 2B12 and C1 of trichoderma, respectively) showed higher cell numbers for the phases prophase, metaphase, anaphase and telophase and reached the highest IM ($\chi^2= 5.45 \alpha= 0.05$), ($\chi^2= 5.0 \alpha= 0.05$) e ($\chi^2= 3.92 \alpha= 0.05$, respectively). The T10 control (liquid medium BD), had the highest number of interphase cells, and the lower phases of cell division. The test with *Allium cepa* roots enables selecting trichoderma isolates that induce increased mitotic index in root tips by the action of metabolites and shows variability among the isolates studied.

Key words: *Allium cepa*. Cell division. Microorganisms. Test plants. *Trichoderma* spp.

INTRODUÇÃO

Os metabólitos produzidos por microrganismos do solo representam um importante grupo para a produção de compostos biologicamente ativos (DONADIO et al., 2002), podendo ser sintetizados via ribossomal e não ribossomal

(KLEINKAUF, VON DOHREN, 1996). Entre estes metabólitos se encontram os antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica, simbiose, e promotores de crescimentos de plantas (DEMAIN, 1992).

Segundo Melo (1998) muitas espécies de trichoderma (*Trichoderma* spp.) estudadas possuem a capacidade de produzir metabólitos tóxicos, tais como antibióticos e enzimas líticas degradadoras da parede celular de fungos fitopatogênicos. Conforme Claydon et al. (1987), são consideradas eficientes tanto pela produção de metabólitos voláteis como de não voláteis, esta capacidade também foi evidenciada por outros autores como BELL et al. (1982), REIS et al. (1995), APARECIDO & FIGUEIREDO (1999) e DURMAN et al. (1999). Assim, fungos do gênero *Trichoderma* incluem espécies economicamente importantes por sua atuação no controle biológico, por apresentarem capacidade de produzir antibióticos e enzimas, e pela produção metabólica com atividades análogas aos hormônios vegetais (CARVAJAL et al, 2009). A promoção do desenvolvimento de plantas por trichoderma pode estar relacionada, entre outros fatores, ao estímulo a multiplicação celular, através do aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta, à produção de hormônios e ao aumento da superfície total do sistema radicular (LUCON, 2009).

Diversos pesquisadores realizam de forma conjunta teste animal *in vitro* e os resultados obtidos são similares aos testes utilizando sistema teste vegetal *in vivo* (TEIXEIRA et al., 2003), propiciando informações de grande importância. O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999). Este sistema teste vegetal de *Allium cepa* é utilizado com regularidade para estudos dos efeitos de extratos vegetais (FACHINETTO et al., 2007), utilizando o índice mitótico como indicador de proliferação adequada das células (GADANO et al., 2002). Desta forma, o presente estudo objetivou a seleção de isolados do agente biológico trichoderma que promovam, através de seus metabólitos, o aumento do índice mitótico em células de pontas de raízes pelo sistema teste de *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade e no Laboratório de Interação Planta-Microrganismo, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS (UFSM).

Isolados de *Trichoderma* spp.

Foram utilizados isolados de trichoderma pertencentes ao Laboratório Planta Microrganismos de *Trichoderma harzianum* (2B2, 2B22, 2B12); *Trichoderma viride* (TSM1, TSM2, C1) e os produtos comerciais Agrotich® (cepas de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, $1 \cdot 10^6$ UFC.g⁻¹, Agri Haus do Brasil) e Trichodermil® WP Organic (cepa especial de *Trichoderma harzianum*, $500 \cdot 10^6$ conídios viáveis.g⁻¹, Itaforte Bioprodutos,).

Bulbos de Cebola

Foram utilizados bulbos de cebola (*Allium cepa*) orgânicos livres de agentes genotóxicos.

Preparo dos metabólitos dos isolados de *trichoderma* spp.

Para o preparo dos metabólitos dos isolados de trichoderma foi colocado para cada isolado um disco de meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), contendo micélio e esporos, em recipientes plásticos de 1.000 mL esterilizados contendo meio líquido BD (batata-dextrose) e incubados por 10 dias sob agitação em mesa orbital (Modelo TE-141, Marca TECNAL) em temperatura ambiente (25°C) e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, posteriormente, os meios de cultura foram filtrados, para separar os metabólitos da massa micelial e esporos, sendo que imediatamente os bulbos de *Allium cepa* (quatro repetições por tratamento) foram dispostos nos recipientes contendo meios de culturas BD filtrados com e sem metabólitos dos isolados de *Trichoderma* spp. para enraizar. Os bulbos foram mantidos nos meios de cultura, entre 5 a 7 dias, até a germinação das radículas.

Os 40 bulbos colocados para enraizar formaram os seguintes tratamentos: T1- metabólitos do isolado 2B2; T2- metabólitos do isolado 2B22; T3- metabólitos do

isolado 2B12; T4- metabólitos do isolado C1; T5- metabólitos do isolado TSM1; T6- metabólitos do isolado TMS2; T7- metabólitos do produto Trichodermil®; T8- metabólitos do produto Agrotich®; T9- controle1 - somente água; T10- controle 2 - somente meio líquido BD (batata-dextrose).

Os grupos foram submetidos aos tratamentos para o enraizamento por sete dias, e após, as radículas foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e a seguir conservadas em álcool 70% sob refrigeração a 10 °C.

Análise da divisão celular das raízes dos bulbos de cebola

Para o preparo das lâminas utilizou-se radículas previamente conservadas em etanol 70%, as quais foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, e em seguida foram lavadas em água destilada e coradas comorceína acética 2% pela técnica de esmagamento (adaptada de Guerra e Souza, 2002). Foi realizada a contagem das células, onde foram contadas 500 células por bulbo em cada uma das lâminas. Foram examinadas observando-se as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, com auxílio de microscópio ótico com a objetiva de 40X. Foram calculados os valores médios do número de células de cada uma das fases do ciclo celular estudadas: interfase e divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase), após calculou-se os índices mitóticos. Fez-se análise estatística dos dados pelo teste χ^2 (Qui-quadrado), com probabilidade de 5%, pelo programa estatístico BioEstat 4.0.

Após a análise, algumas lâminas foram seladas, com cola para reparo de câmaras de bicicleta (cimento vulcanizante) e foram armazenadas em geladeira por um dia e então foi realizada a montagem de lâminas permanentes com o uso de meio de inclusão rápida (ENTELAN).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da análise do ciclo celular de células de *Allium cepa* são apresentados nas Tabelas 1 e 2. O número total de células analisadas e o número de células nas diferentes fases do ciclo celular: interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, obtidas a partir de pontas de raízes de cebola tratadas com

metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. podem ser observados na Tabela 1.

Os tratamentos T1, T3 e T4 (metabólitos dos isolados 2B2, 2B12 e C1 de trichoderma, respectivamente) apresentaram os menores números de células em interfase e os maiores para as fases prófase, metáfase, anáfase e telófase (Tabela 1). O tratamento controle T10 (meio líquido BD), apresentou o maior número de células em interfase (1962 células), e o menor nas fases da divisão celular. Um maior número de células em interfase (1958 células) também foi observado para o tratamento controle T9 (água). O tratamentos controle T10 e T9 (meio líquido BD batata-dextrose e água, respectivamente) apresentaram pouca diferença em relação aos tratamentos com metabólitos T8 (Agrotrich®), T7 (Trichodermil®), T6 (isolado TSM2), T5 (isolado TSM1) e T2 (isolado 2B22) que apresentaram 1940, 1961, 1959, 1947 e 1947 células em interfase, respectivamente, portanto esses tratamentos apresentaram os menores números de células em divisão (Tabela 1) em prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Tabela 1 – Número de células no ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) em pontas de raízes de cebola tratadas com metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Número de células nas fases do ciclo celular				
	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
T1	1891	46	35	12	16
T2	1947	21	15	9	8
T3	1900	48	32	13	15
T4	1921	33	25	9	12
T5	1947	23	17	6	7
T6	1959	19	11	5	6
T7	1961	18	11	4	6
T8	1940	15	26	9	10
T9	1958	9	15	6	12
T10	1962	25	3	5	5

T1- metabólitos do isolado 2B2; T2- metabólitos do isolado 2B22; T3- metabólitos do isolado 2B12; T4- metabólitos do isolado C1; T5- metabólitos do isolado TSM1; T6- metabólitos do isolado TMS2; T7- metabólitos do produto Trichodermil®; T8- metabólitos do produto Agrotrich®; T9- controle 1 - somente água; T10- controle 2 - somente meio BD (batata-dextrose).

A Tabela 2 apresenta o total médio do índice mitótico (IM), o número total de células analisadas, e o número total de células em divisão celular, tanto para os bulbos controle como para os bulbos tratados com os metabólitos de trichoderma. Conforme esperado, os tratamentos T1, T3 e T4 (metabólitos dos isolados 2B22, 2B12 e C1, respectivamente) alcançaram os maiores IM ($\chi^2 = 5.45$ $\alpha = 0.05$), ($\chi^2 = 5.0$ $\alpha = 0.05$) e ($\chi^2 = 3.92$ $\alpha = 0.05$), respectivamente, diferindo estatisticamente dos tratamentos controles na ausência de metabólitos de diferentes isolados (2,07 e 1,87% para T9 e T10, respectivamente), demonstrando serem isolados capazes de promover a divisão celular. Por sua vez, os metabólitos dos isolados 2B22, TSM1, TSM2, produto Trichodermil® e o produto Agrotrich®, em relação aos tratamentos controle não apresentaram diferenças significativas para os índices mitóticos, não promovendo, portanto, a divisão celular em pontas de raízes, o que demonstra que a capacidade de aumentar o índice mitótico é uma característica variável entre os isolados estudados. Os tratamentos com os IM menores alcançaram valores de ($\chi^2 = 1.92$ $\alpha = 0.05$) e ($\chi^2 = 1.87$ $\alpha = 0.05$), tratamento 7 e 10, respectivamente.

Tabela 2 – Índice mitótico de células de pontas de raízes de cebola tratadas com metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Interfase	Número Total de Células	Células em Divisão
T1	1891	2000	109
T2	1947	2000	53
T3	1900	2000	100
T4	1921	2000	79
T5	1947	2000	53
T6	1959	2000	41
T7	1961	2000	39
T8	1940	2000	60
T9	1958	2000	42
T10	1962	2000	38

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste χ^2 .

T1- metabólitos do isolado 2B2; T2- metabólitos do isolado 2B22; T3- metabólitos do isolado 2B12; T4- metabólitos do isolado C1; T5- metabólitos do isolado TSM1; T6- metabólitos do isolado TMS2; T7- metabólitos do produto Trichodermil®; T8- metabólitos do produto Agrotrich®; T9- controle 1 - somente água; T10- controle 2 - somente meio BD (batata-dextrose).

As células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* foram utilizadas como sistema teste vegetal, através da análise do seu ciclo celular, cujo estudo serve como indicativo para avaliar o desempenho de bioagente.

Fungos do gênero trichoderma apresentam a capacidade de promover o crescimento de plantas (ALTAMORE et al., 1999), possivelmente pela capacidade de produção metabólica, assim induzindo a multiplicação celular. Carvajal *et al.* (2009), avaliaram a produção de metabólitos de 101 isolados de trichoderma da Colômbia, 20% das cepas foram capazes de produzir formas solúveis de fosfato de rocha fosfática, 8% das amostras avaliadas mostraram capacidade de produzir sideróforos consistentes para converter ferro a formas solúveis, 60% produziram ácido indol-3-acético (IAA) ou análogos a auxina. A produção destes metabólitos é uma característica de isolados específicos, como foi verificado no presente trabalho, demonstrando haver diferença no comportamento dos isolados em relação à síntese metabólica.

Em estudos realizados com *Arabidopsis thaliana* investigaram o papel da auxina produzida e isolada de *Trichoderma* spp. na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta em resposta à inoculação de *T. virens* e *T. atroviride* desenvolvendo um sistema de interação fungo-planta, o qual resultou em características fenotípicas relacionadas com a auxina, como o aumento da produção de biomassa e estimulação do desenvolvimento das raízes laterais (CONTRERAS-CORNEJO, 2009). Diversos trabalhos mostram o efeito benéfico de espécies de *Trichoderma* na promoção do desenvolvimento vegetal. Filho et al. (2008) concluíram que o isolado CEN 262 de *Trichoderma* spp. proporcionou maior índice de desenvolvimento de partes aéreas de mudas de eucalipto.

Reguladores vegetais podem incrementar o crescimento e o desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, a diferenciação e o alongamento celular, espécies de trichoderma produzem metabólitos cuja atividade são análogas a estes reguladores de crescimento (CARVAJAL et al, 2009).

Em estudo realizado por Fortes et al. (2007) foi observado que a sobrevivência de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. aumentou por meio do tratamento com isolados de *Trichoderma* spp. e também promoveu um aumento na porcentagem de enraizamento, comprovando que algumas linhagens aumentam a superfície total do sistema radicular, possibilitando um maior acesso aos elementos minerais (HARMAN, 2004).

Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que há diferença no comportamento dos metabólitos dos diferentes isolados de trichoderma em relação ao índice mitótico de *Allium cepa*, que provavelmente algumas espécies e isolados demonstram conter componentes que interagem com o DNA. Há demonstração de que houve estímulo da divisão celular das raízes de *Allium cepa*, conforme o aumento da concentração dos metabólitos produzidos por alguns isolados. Estes isolados potencializaram melhor a produção no tempo, se adaptando ao meio, conferindo assim, diferença no número de fases em divisão em relação aos demais, que não atingiram o mesmo nível de produção metabólica, a tempo de causar efeito promotor da divisão celular.

Em estudo com extrato de plantas medicinais, Camparoto et al (2002), pesquisaram o efeito sobre células de pontas de raízes de cebola utilizando o teste de *Allium cepa*, ao contrário do observado para os metabólitos de trichoderma, as infusões causaram declínio do número de células em divisão em relação aos controles.

Os resultados obtidos a partir de estudos utilizando o sistema teste de *Allium cepa* são considerados satisfatórios como indicativos de potencial dos indutores de plantas sobre as células, como no caso do presente trabalho, que de maneira inovadora, observou a interferência de metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. em pontas de raízes.

O teste com raízes de *Allium cepa* utilizado para a observação do aumento do índice mitótico poderá auxiliar outros experimentos de seleção *in vitro* e *ex vitro* com isolados do bioagente trichoderma, promotores de enraizamento e crescimento.

CONCLUSÃO

O teste com raízes de *Allium cepa* possibilita selecionar isolados de *Trichoderma* spp. que induzem o aumento do índice mitótico em pontas de raízes pela ação de metabólitos. A capacidade de aumentar o índice mitótico de células de pontas de raízes de *Allium cepa* apresenta variabilidade entre os isolados estudados.

REFERÊNCIAS

ALTAMORE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p.2926- 2933, 1999.

APARECIDO, C.C., FIGUEIREDO, M.B. Antagonismo de *Trichoderma viride* a diferentes fungos fitopatogênicos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FIPATOLOGIA, 22, 1999, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal.

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

CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research -Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.426, n.2, p.211-214, 1999.

CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA R.O.; MANTOVANI M.S.; VICENTINI V.E.P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.1, n.25, p.85-89, 2002.

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

CHAUHAN, L.K.S.; SAXENA P.N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, p.181-189, 1999.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R. antifungal alkyl- pyrones produced by *trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, pt-4, p.503-513, 1987.

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

DEMAIN, A. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: **Secondary metabolites: their function and evolution**. Chichester: J. Wiley, Nova York, 1992. p.3-23.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA, R.; MAZZA, P.; CHIOCCHINI, C.; CAVALETTI, L.; SOSIO, M.; PUGLIA, A. M. Microbial Technologies for the Discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v.99, p. 187-98, 2002.

DURMAN, S.; MENENDEZ, A.; GODEAS, A. Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* *in vitro* y como biocontrolador del damping-off de plantas de tomate en invernadero. **Revista Argentina de Microbiología**, v.31, p.13-18, 1999.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C.F.; TEDESCO S. B. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia: Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.17, n.1, p.49-54, 2007.

FILHO, M.R.C. Mello, S.C.M.; Santos, R.P. e Menêzes, J.E. (2008) - **Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 226. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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

GADANO, A.; GURNI A.; LÓPEZ P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*.L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, n.1, p.11-16. 2002.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. 1 (ribeirão preto: ed. funpec). 2002.

HARMAN, G.E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A. E.; CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Plant Physiology**, v.94, n.2, p.146 -153, 2004.

KLEINKAUF, H.; VON DÖNREN, H. A. nonribosomal sistem of peptide biosynthesis European. **Journal of biochemistry**, Oxford, v.236, p.335-351, 1996.

LUCON, C.M.M. (2009) - Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* Spp. (em linha). Infobibos, Informações Tecnológicas. (Acesso em 2013.05.29). Disponível em: <
http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm >.

MELO, I.S. de. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. Cap. 9. 388p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15). Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. V.1. Cap. 1. 262p.

REIS, A.; OLIVEIRA, S.M.A.; de, MENEZES, M. M.; MARIANO, R. de L.R. & de OLIVEIRA, S.M.A. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.21, n.1, p.16-20, 1995.

TEIXEIRA, R.O., CAMPAROTO, M.L., MANTOVANI, M.S., VICENTINI, V.E.P. Assesment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.551-555, Brasil. 2003.

ARTIGO II

Antagonismo a fungos associados às sementes de *Paspalum notatum* flügge por trichoderma

RESUMO

Sementes de espécies vegetais do bioma Pampa como *Paspalum notatum* geralmente possuem baixo poder germinativo, o que pode estar relacionado a microrganismos patogênicos. Entre os principais microrganismos antagonistas, está o gênero trichoderma. O objetivo do presente trabalho foi analisar a incidência, identificar os gêneros de fungos presentes nas sementes da espécie *P. notatum*, e verificar o potencial antagônico de *Trichoderma* spp. Para a identificação dos fungos associados às sementes utilizaram-se os métodos do papel de filtro e do plaqueamento em meio ágar sólido BDA (batata dextrose ágar). Com a técnica *in vitro* de confrontação direta foi observada a ação do antagonista sobre três fungos contaminantes de maior incidência, *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. e *Geniculosporium* sp. Utilizaram-se cinco isolados de trichoderma, TSM1, C1, 2B2, 2B12 e 2B22 e o produto comercial Trichodermil®, mais três tratamentos testemunhas, contendo somente os fungos isolados. Pelo método de plaqueamento em meio de cultura BDA é possível identificar microrganismos não detectados pelo método do papel de filtro. *Curvularia* sp. é o gênero de maior frequência nas sementes de *Paspalum notatum*. O isolado 2B2 mostra alta eficiência no confronto aos gêneros de fungos associados às sementes de *Paspalum notatum*.

Palavras-Chave: Grama forquilha. *Trichoderma* spp. Sanidade.

ABSTRACT

Antagonism to fungi associated with seeds of *Paspalum notatum* flügge By *Trichoderma*

Seeds of plant species pampa biome as *Paspalum notatum* generally have low germination, which may be related to pathogenic microorganisms. Among the main antagonists microorganisms, is the genus *Trichoderma*. The objective of this study was to analyze the incidence, identify the fungal species present in the seeds of *P. notatum*, and check the antagonistic potential of *Trichoderma* spp. to identify the fungi associated with the seeds we used the methods of filter paper and plating on solid agar PDA (potato dextrose agar). With the in vitro technique of direct confrontation of the antagonist action on three fungal contaminants of greatest incidence, *Fusarium* sp. was observed, *Curvularia* sp. and *Geniculosporium* sp. we used five strains of *Trichoderma* , TSM1, C1, 2B2, 2B12 and 2B22 and commercial product *Trichodermil*[®], three witnesses treatments containing only fungal isolates. By the method of plating on PDA culture medium is not possible to identify microorganisms detected by the filter paper method. *Curvularia* sp. is the genre most often the seeds of *Paspalum notatum*. The isolated 2B2 shows high efficiency in comparison to genera of fungi associated with seeds of *Paspalum notatum*.

Keywords: Grass fork. *Trichoderma* spp. Sanity.

INTRODUÇÃO

Microrganismos fitopatogênicos influenciam negativamente a qualidade fisiológica das sementes, a sua presença pode resultar em redução no potencial germinativo, e posteriormente no rendimento da espécie (PEDROSO, 2009).

Além disso, as sementes infectadas podem disseminar agentes fitopatogênicos de uma região para outra, podendo contaminar áreas isentas de doenças (LAZAROTTO et al., 2012).

Deve ser dada grande atenção aos fungos por sua capacidade de sobrevivência em diversas condições ambientais em associação à sementes (KRUPPA E RUSSOMANNO, 2009). No entanto, entre os principais gêneros de microrganismos antagonistas, que possuem a habilidade de combater patógenos associados às sementes, está o gênero *Trichoderma*. Espécies de *Trichoderma* são eficientes contra uma série de fungos fitopatogênicos, atuando tanto pela produção de metabólitos voláteis como de não voláteis (CLAYDON et al., 1987). Há variação entre espécies e entre isolados da mesma espécie em relação à capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida.

A espécie vegetal de estudo, *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae), propaga-se por sementes. Por sua vez, o gênero *Paspalum* nas pastagens nativas do RS, é caracterizado como o gênero de maior importância sob o ponto de vista forrageiro (TOWNSEND, 2008). Portanto, testes de sanidade são essenciais para assegurar o sucesso do estabelecimento nos plantios (MAEDA et al., 1997). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a incidência, identificar os gêneros de fungos presentes nas sementes da espécie *Paspalum notatum*, e verificar o potencial competitivo antagônico em relação a fungos fitopatogênicos de *Trichoderma* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

A identificação dos fungos associados às sementes foi realizada utilizando-se os métodos do papel de filtro e do plaqueamento em meio ágar sólido BDA (batata dextrose ágar). Estes dois tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento, cada parcela

experimental constituída por 25 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. Antes da semeadura, as sementes passaram por um processo de desinfecção superficial em câmara de fluxo laminar, que consistiu da imersão das mesmas por 1 minuto em álcool 70%, 10 minutos em hipoclorito de sódio 1% e três lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada.

No método de papel de filtro utilizaram-se caixas tipo gerbox (11 x 11 cm) previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 10%, posteriormente em álcool 70% e três folhas de papel de filtro em cada, tratadas em autoclave (120°C/40 minutos), onde foram colocadas as sementes umedecidas com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel de filtro (BRASIL, 2009). As sementes foram incubadas em câmara BOD por 8 dias a 25°C em um regime alternado de luz (12 horas com luz e 12 horas sem luz).

No Método de plaqueamento em meio ágar sólido utilizou-se meio de cultura BDA (200g de batata, 20g de dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada). As sementes foram colocadas sobre a superfície do meio de cultura BDA vertido nas placas. Após a semeadura, as placas foram incubadas durante oito dias a 25°C, em um regime alternado de luz (12 horas com luz e 12 horas sem luz). Decorrido o período de incubação, em ambos os tratamentos, procedeu-se a observação dos microrganismos presentes com base em leituras individuais de cada parcela, bem como a confecção de lâminas e observação das estruturas fúngicas em microscópio óptico e a identificação baseando-se em características morfológicas e literatura pertinente para confirmação dos resultados (BARNETT E HUNTER, 2006).

Os dados foram transformados em percentuais de incidência para cada microrganismo.

Técnica *in vitro* de confrontação direta

Com a técnica *in vitro* de confrontação direta foi observada a ação do antagonista sobre três fungos contaminantes de maior incidência, isolados previamente das sementes de *P. notatum*. Utilizaram-se cinco isolados de trichoderma, TSM1, C1, 2B2, 2B12 e 2B22, e o produto comercial Trichodermil® combinados com três fungos contaminantes: *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. e *Geniculosporium* sp., mais três tratamentos testemunha contendo somente os fungos contaminantes. Um disco de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar),

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

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

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 6 x 3 + 3, dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análise da frequência e identificação de microrganismos associados às sementes de *Paspalum notatum*

Por meio dos métodos de papel de filtro e plaqueamento em meio de cultura BDA foi possível à detecção de gêneros fúngicos associados às sementes de *Paspalum notatum*, que estão apresentados na Tabela 1. Pelo método de papel de filtro foram detectados os gêneros *Curvularia*, *Fusarium* e *Geniculosporium*, enquanto que pelo método de plaqueamento em meio de cultura BDA, observaram-se além destes três, o gênero *Aspergillus*. O número de gêneros não foi maior dos que foram encontrados devido à desinfestação superficial realizada nas sementes antes da semeadura. Vanzolini et al. (2010) detectaram alta frequência de espécies fúngicas, entre elas o gênero *Fusarium*, encontradas também nas sementes de

Paspalum notatum, e outros gêneros como *Macrophomina*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Helminthosporium*, *Epicoccum* e *Nigrospora*.

Tabela 1. Frequência de fungos (%) associados às sementes de *Paspalum notatum* detectados em papel de filtro e meio de cultura BDA.

Gêneros de Fungos	(% Incidência)	
	BDA	PAPEL DE FILTRO
<i>Aspergillus</i>	1,75	0
<i>Geniculosporium</i>	2,00	0,75
<i>Curvularia</i>	36,00	9,25
<i>Fusarium</i>	1,25	2,00
FNI	6,00	0,25
Total de sementes contaminadas+	45	12,25

FNI* = fungos não identificados

Os gêneros *Fusarium*, *Curvularia* e *Geniculosporium* foram observados em todos os tratamentos avaliados.

Medeiros (1995) relata que os gêneros *Fusarium* e *Curvularia* são associados às sementes de aroeira (*Astronium urundeuva*) e outras espécies florestais. Maciel et al. (2012) identificou o gênero *Fusarium* associado a sementes de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*), sendo que *Fusarium* sp. foi patogênico às plântulas, causando apodrecimento dos cotilédones e má formação do sistema radicular. Souza et al. (2012) encontraram os gêneros *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp. em sementes de ipê-rosa (*Tabebuia impetiginosa*), e em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia ochracea*). Estes dois gêneros estão entre os fungos mais frequentes em sementes de aveia preta da zona sul do Rio Grande do Sul (BEVILAQUA, 1995).

Curvularia sp. é citado como um dos gêneros mais frequente em estudo sobre a associação de fungos em espécies ornamentais (BARRETO et al., 2011). O gênero *Geniculosporium* não é frequentemente associado às sementes de espécies

de plantas, possivelmente em função do número reduzido de trabalhos. Porém em *Licuala ramsayi*, palmeira tropical australiana, foi observado o gênero *Geniculosporium* a partir de folhas não expandidas e abertas (RODRIGUES & SAMUELS, 1990).

O gênero *Curvularia*, observado em 9,25% das sementes semeadas em papel de filtro e 36% em BDA, causa mancha nas folhas e nas glumas em gramíneas. Os sintomas são caracterizados por manchas marrom-avermelhadas ou escurecimento total. Em alguns casos as manchas restringem-se à parte superior ou inferior das glumas e apresentam centro mais claro (PRABHU et al., 1999).

Fusarium sp. foi encontrado em 2% das sementes no papel de filtro e 1,25% em BDA. Este gênero é disseminado por meio de propágulos e sobrevive no solo em restos culturais sendo suas estruturas de resistência denominadas clamidósporos. Estes esporos persistem por longos períodos em regiões de alta temperatura e baixa umidade (SARTORATO E RAVA, 1994).

A frequência do gênero *Geniculosporium* nas sementes de *P. notatum*, foi de 2% e 0,75% em BDA e papel de filtro, respectivamente. Espécies de *Geniculosporium* são comumente encontrados como endófitos de espécies arbóreas (PETRINI, 1985).

Por sua vez, o gênero *Aspergillus* não foi observado no papel de filtro, porém foi encontrado em 1,75% das sementes no BDA. Conforme Vechiato (2010), *Aspergillus* sp. faz parte do grupo dos fungos de armazenamento, que podem invadir a semente e causar podridão e deterioração das mesmas. Espécies desse gênero podem estar presentes como contaminantes ou sob a forma de micélio dormente, uma vez que sobrevivem nas sementes mesmo com baixos teores de umidade.

Microrganismos não identificados foram detectados nos tratamentos em BDA. Conforme Neergaard (1979) é comum o aparecimento de microrganismos variados como bactérias em testes de plaqueamento em ágar. É preciso considerar que há poucas informações sobre esses microrganismos em relação à ocorrência de doenças em plantas.

Para a identificação de microrganismos em sementes de espécies nativas do bioma Pampa, como do *P. notatum*, são necessárias informações sobre a associação patógeno-semente envolvendo estas espécies, as quais são escassas por serem pouco estudadas, sendo a primeira etapa para avaliar os danos que doenças podem causar às sementes e às mudas (BOTELHO et al., 2008),

permitindo recomendar tratamentos específicos para microrganismos causadores de danos na espécie estudada (LAZAROTTO, 2010).

Antagonismo *in vitro* de trichoderma a fungos presentes nas sementes de *P. notatum*

Aos oito dias do teste, o isolado 2B2 apresentou ótimo desempenho, obtendo a nota 1,0 no confronto aos três patógenos testados (Tabela 2). O isolado 2B22, mostrou eficiência no confronto a *Curvularia sp.* e *Fusarium sp.*, com nota 1,0 em ambos. Além dos isolados TSM1, C1 na confrontação com *Curvularia sp.* e o isolado 2B12 com *Fusarium sp.*, com notas de 1,0 em todos os casos. Os isolados TSM1, C1, 2B22 e 2B12 na confrontação direta a *Geniculosporium sp.*, com exceção do 2B2, obtiveram notas de 2,0, 2,0, 2,0 e 2,0 respectivamente. O produto comercial Trichodermil® aos oito dias, não obteve bom desempenho no confronto aos três patógenos testados, atingindo a nota 2,0 para cada fungo contaminante. Na segunda avaliação, realizada após 11 dias da incorporação do antagonista, os isolados 2B22, 2B12, TSM1, C1 e o produto comercial Trichodermil® aos 11 dias, não demonstraram melhora no desempenho, com relação ao confronto aos três patógenos testados.

Tabela 2. Média das notas de antagonismo de isolados de trichoderma a três fungos de maior frequência associados às sementes de *Paspalum notatum*.

Média das notas						
Tratamentos	<i>Curvularia sp.</i>		<i>Fusarium sp.</i>		<i>Geniculosporium sp.</i>	
	8 dias	11 dias	8 dias	11 dias	8 dias	11 dias
TSM1	1	1	2	2	2	2
2B2	1	1	1	1	1	1
2B12	2	2	1	1	2	2
2B22	1	1	1	1	2	2
C1	1	1	2	2	2	2
Trichodermil®	2	2	2	2	2	2
Testemunha	4	4	3	3	5	5

Os isolados de *Trichoderma* spp. além da antibiose, demonstraram que possuem outras habilidades como agentes de biocontrole. Conforme Bettiol (1991), uma característica importante é que o antagonista atue por meio de mais de um mecanismo, combinando antibiose, parasitismo, competição e estímulo à defesa do hospedeiro.

No presente estudo, possivelmente ocorreu antibiose, hiperparasitismo e competição. Segundo Santos (2008), espécies de trichoderma possuem a habilidade como agente antagonista, inibindo a ação de fitopatógenos, que podem interferir no desenvolvimento normal da planta. Louzada et al. (2009) acrescentam que este fungo no controle de fitopatógenos, desenvolve ação direta e apresenta melhor exploração do solo pelo sistema radicular.

O potencial hiperparasítico de *Trichoderma* spp. está relacionado com a competição e com atividades metabólicas (HARMAN, 2000). Contudo, os mecanismos de ação podem estar relacionados às características específicas de cada isolado, o que possivelmente explica as diferenças observadas no desempenho.

CONCLUSÕES

Pelo método de plaqueamento em meio de cultura BDA é possível identificar microrganismos não detectados pelo método do papel de filtro.

Curvularia sp. é o gênero de maior frequência nas sementes de *Paspalum notatum*.

O isolado 2B2 mostra alta eficiência no confronto aos gêneros de fungos associados às sementes de *Paspalum notatum*.

REFERÊNCIAS

BARNETT, H.L. AND HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4^a ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 2006. 218 p.

BARRETO, S. S.; REZENDE V. D.; BLUM, E. L. B. Fungos em sementes de plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 3, p. 561 - 573. 2011.

BEVILAQUA, G. A. P.; PIEROBOM, C. R. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de aveia preta (*avena strigosa* schreb) da zona sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 17, nº 1, p. 19-22, 1995.

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

BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. (Boletim Técnico, n.5). Brasília: Embrapa, 1991. 5 p.

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

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 395 p.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R. Antifungal alkil pyrones produced by *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, p. 503 - 513, 1987.

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

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; MACIEL, C. G.; LONGHI, S. J. Sanidade, Transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrella fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 22, p. 493 – 503, 2012.

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

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. **Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. Originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*** .*Biota Neotrop.* Jul/Sep 2009 v. 9, no. 3 Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v9n3/pt/abstract?article+bn02509032009>> Acesso em 25 de agosto de 2013. ISSN 1676-0603.

KRUPPA, P. C. E RUSSOMANNO, O. M. R. Fungos em plantas medicinais, aromáticas e condimentares – solo e semente. **Comunicado Técnico Nº 93**, São Paulo: Instituto Biológico - Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2009.

MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. dos; LAZAROTTO, M. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 4, p. 323-328, 2012.

MAEDA, J.A.; PEREIRA, M. DE F.D.A. Caracterização, beneficiamento e germinação de sementes de *Paspalum notatum* Flugge. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, p.100-105, 1997.

MEDEIROS, A. C. S.; MENDES, M. A. S.; FERREIRA, M. A. S. V.; ARAGÃO, F. J. L. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a sementes de aroeira (*astronium urundeuva* (fr. all.) engl.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 14, nº 1, p. 51-55, 1992.

NEERGARD, P. **Seed Pathology**. London: The Macmillan, 1979. 289p.

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

PETRINI, L.; PETRINI, O. Xylariaceous fungi as endophytes. **Sydowia**. v. 38, p. 216-234, 1985.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M.C.; RIBEIRO, A.S. DOENÇAS E SEU CONTROLE. IN:

VIEIRA, N.R. DE A.A.; SANTOS, A.B. DOS & SANT'ANA, E.P. (Ed.) **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p.262-307.

RODRIGUES, K. F. & SAMUELS, G.J. 1990. Preliminary study of endophytic fungi a tropical palm. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, p.827-30.

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

SANTOS, H. A. **Trichoderma spp. como promotores de crescimento em plantas e como Antagonistas a Fusarium oxysporum**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em ciências agrárias) – Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SARTORATO, A. E RAVA, C. A. **Principais Doenças do Feijoeiro Comum e seu Controle**. Brasília: Embrapa – SPI, 1994. 300 p.

SOUZA, A. de A.; NASCIMENTO, C. R. do; SILVA, A. da C. D. da; BARBOSA, R. N. T.; ANDRADE, J. K. C. de; NASCIMENTO, J. F.do. Incidência de fungos associados a sementes de ipê-rosa (*Tabebuia impetiginosa*) e ipê-amarelo (*Tabebuia ochracea*) em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, Roraima, v. 6, n. 1, p. 34-39, 2012.

TOWNSEND, C. R. **Características produtivas de gramíneas nativas do gênero Paspalum, em resposta à disponibilidade de nitrogênio**. 2008. 267 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

VANZOLINI, S.; MEORIN, E. B. K.; SILVA, R. A.; NAKAGAWA, J. Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 32, p. 09 – 14, 2010.

VECHIATO, M. H. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. **Comunicado Técnico Nº 136**, São Paulo: Instituto Biológico - Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2010.

ARTIGO III

Emergência de plântulas e análise morfogênica de *Paspalum notatum* Flügge por *Trichoderma* spp. e bioestimulante Stimulate®

RESUMO

A gramínea perene *Paspalum notatum*, nativa do bioma Pampa, Rio Grande do Sul, possui alto valor forrageiro, mas apresenta sementes com dificuldade de germinação. O objetivo do presente trabalho foi verificar a porcentagem de plântulas emergidas de *P. notatum* na presença de três isolados do agente biológico *Trichoderma* spp. (2B12, 2B2 e C1), e do bioestimulante stimulate®, com e sem a exclusão de estruturas de revestimento das sementes (pré-tratamento selecionado previamente) e realizar análise morfogênica. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, e constou de um total de 16 tratamentos, com quatro repetições, incluindo os tratamentos controle, cada um dos três isolados o stimulate®, a combinação de cada um dos três isolados mais stimulate®, todos com e sem o pré-tratamento. Para as avaliações das características morfogênicas, foram escolhidos aleatoriamente quatro perfilhos por tratamento, sendo os mesmos monitorados quanto ao aparecimento e alongamento de folhas e senescência. Este monitoramento era realizado duas vezes por semana. A exclusão de estruturas de revestimento das sementes mostrou-se eficiente como pré-tratamento para a germinação de sementes. Os tratamentos com stimulate®, na ausência e presença do isolado 2B12, com pré-tratamento, e o stimulate® na presença do isolado 2B2 sem pré-tratamento, apresentaram índices de velocidade de emergência, de 13.93, 14.48, e 12.75, respectivamente, diferindo estatisticamente do controle. A presença do bioestimulante stimulate® auxilia a produção de massa seca e a taxa de alongamento inicial da folha (TAIF) interfere positivamente, na massa seca da parte aérea.

Palavras chaves: *Bioma pampa, Paspalum notatum, Bioestimulante, Trichoderma* spp.

ABSTRACT

Seedling emergence and analysis of *Paspalum notatum* Flügge morphogenic by *Trichoderma* spp. and biostimulating Stimulate®

The perennial grass *Paspalum notatum*, a native of Pampa biome, Rio Grande do Sul, has high forage value but has difficulty with seed germination. The aim of this study was to determine the percentage of emerged seedlings *P. notatum* the presence of three isolates of *Trichoderma* spp. biological agent (2B12, 2B2, C1), and stimulate® growth with and without structures to the exclusion of seed coating (pre-treatment previously selected) morphogenic and perform analysis. The experiment was arranged in a completely randomized design and consisted of a total of 16 treatments with four replications, including control treatments, each of the three isolates stimulate®, the combination of each of the three isolates stimulate®, all with and without pretreatment for the evaluations of morphogenesis, four randomly selected tillers per treatment, the same monitored for the appearance and leaf elongation and senescence. This monitoring was performed two times per week. The exclusion of seed coating structures proved effective as a pretreatment for germination of seeds. The treatments stimulate®, in the absence and presence of isolated 2B12, with pre-treatment, and stimulate® in the presence of isolated 2B2 without pretreatment, showed rates of emergence rate of 13.93, 14.48 and 12.75, respectively, statistically different from control. The presence of biostimulating ® helps stimulate the production of dry matter and the initial rate of elongation of the sheet (TAIF) positively interfere in the dry weight of shoots.

Keywords: *Pampa Biome, Paspalum notatum, biostimulating, Trichoderma* spp.

INTRODUÇÃO

O bioma Pampa onde se encontra a espécie *Paspalum notatum*, compõe grande parte do território do Rio Grande do Sul, parte da Argentina e todo o território do Uruguai (BOLDRINI et al., 2010). Apresenta riqueza de flora e fauna, além de papel significativo na conservação da biodiversidade (BINKOWSKI, 2009). Há cerca de 2.200 espécies campestres, constituindo um patrimônio genético considerável. Segundo IBGE (2004), as áreas que compreendem o bioma Pampa podem permanecer estáveis, mesmo na ausência de manejo.

O gênero *Paspalum* ocupa um lugar de destaque entre as gramíneas nativas, envolvendo o maior número de espécies e, também, com destacáveis valores forrageiros (VALLS, 1987). A espécie *P. notatum*, gramínea perene, vegeta bem em solos mais secos, arenosos e relativamente pobres, sendo resistente ao pisoteio, com propagação por sementes e mediante o desenvolvimento e ramificação de rizomas supraterrâneos, formando uma pastagem bem consistente (PESKE & BOYD, 1980). Esta espécie é utilizada em pomares cítricos nas entrelinhas com a finalidade de dar sustentação nas relações hídricas das plantas (FIDALSKI et al., 2006) e como bioindicadora da presença de flúor no solo (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005). A adaptação favorável de espécies forrageiras nativas como o *P. notatum* às condições edafoclimáticas, aumentam o interesse pelo seu cultivo (NABINGER, 1997; MARASCHIN, 1999). Conforme Borghetti e Ferreira (2004), a germinação para o critério agrônomo ou tecnológico é a emergência de planta no solo ou a formação de uma plântula no solo ou a formação de plântula vigorosa no substrato utilizado. Neste contexto estão inseridos o agente biológico e o bioestimulante stimulate® que servem como promotores da germinação. *Trichoderma spp.* é um fungo natural do solo, que se desenvolve em solos orgânicos, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (MELO, 1998). Segundo Altomare et al. (1999), espécies de trichoderma estão entre os microrganismos mais estudados como agentes de biocontrole de fitopatógenos, além de apresentarem atividades promotoras de germinação e crescimento vegetal. Já os bioestimulantes vegetais a base de hormônios, buscam potencializar o desenvolvimento inicial da cultura. O uso de bioestimulantes como no caso do Stimulate® pode incrementar o crescimento e o desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, a diferenciação e o alongamento celular, podendo, também, aumentar a absorção e a utilização de água

e nutrientes pelas plantas (VIEIRA & CASTRO 2004). Análise morfogênica pode ser definido como o estudo da origem e desenvolvimento em uma planta dos seus diferentes órgãos e suas modificações no espaço, ao passar do tempo (CHAPMAN e LEMAIRE, 1993). O objetivo do trabalho foi estudar a emergência de plântulas de *P. notatum*, com e sem a exclusão de estruturas de revestimento das sementes, na presença dos isolados 2B12, 2B2 e C1 de *Trichoderma* spp. e do bioestimulante stimulate®.

MATERIAL E METODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Interação Planta-Microrganismo, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS (UFSM).

Bioestimulante Stimulate®

O produto Stimulate® (Stoller do Brasil Ltda) é composto por Ácido 4-Indol-3-Ilbutírico a 0,05 g/L; Cinetina 0,09 g/L e ácido giberélico 0,05 g/L. A dose utilizada foi de 5 ml do composto para cada quilo de sementes.

Isolados de *Trichoderma* spp.

Foram utilizados isolados de trichoderma pertencentes ao Laboratório Planta Microrganismos de *Trichoderma harzianum*, 1.10^8 UFC.g⁻¹ (2B2, 2B12); *Trichoderma viride*, 1.10^8 UFC.g⁻¹ (C1) na forma de pó-biológico selecionados em estudo anterior, isolados do agente biológico trichoderma que promoveram, através de seus metabólitos, o aumento do índice mitótico em células de pontas de raízes pelo sistema teste de *Allium cepa* (FACHINETTO et al., 2007).

Preparo do pó biológico de *Trichoderma*.

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

Pré-tratamentos para a germinação de *P. notatum*

O teste de pré-tratamento das sementes constou de: Tratamento 1 - (controle) substrato sobre papel filtro, previamente umedecido com água destilada; Tratamento 2 - Embebição em nitrato de potássio (KNO₃), as sementes foram colocadas sobre substrato previamente umedecido com uma solução de nitrato de potássio, em concentração de 0,2%; Tratamento 3 - as sementes de *P. notatum* foram expostas à fricção física e com auxílio de pinças retirou-se completamente as estruturas de revestimento lema e pálea, em microscópio estereoscópico. Em todos os tratamentos sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 15 min. A incubação ocorreu em estufa para B.O.D, fotoperíodo de 12h, temperatura média de 25°C. O teste foi arranjado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes cada. A avaliação da germinação final ocorreu ao vigésimo oitavo dias após o início do experimento. Os dados obtidos foram submetidos à comparação de medias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Técnica do papel celofane: germinação das sementes de *P. notatum* *in vitro*.

Este teste como objetivo estudar preliminarmente a germinação das sementes *in vitro* nas presenças do bioestimulante stimulate®, três isolados de trichoderma (2B2, 2B12, C1), e a combinação entre ambos. O teste foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, em quatro repetições por tratamento, constituída por 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. Foi utilizada a técnica *in vitro* do papel celofane, modificada de Ethur (2002) que constou de dezoito tratamentos (Quadro 2), com e sem pré-tratamento (exclusão das estruturas de revestimento das sementes de *P. notatum*). Metabólitos não-voláteis de três isolados de trichoderma spp. (2B2, 2B12, C1) produzido pela técnica do papel celofane, bioestimulante stimulate® e a combinação entre os metabólitos não-voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. e o bioestimulante stimulate®, além do controle com pré-tratamento ágar-água + BD(extrato de batata, dextrose); ágar-água e o controle sem pré-tratamento ágar-água + BD; ágar-água. O meio de cultura utilizado foi uma mistura de meio de cultura ágar-água e meio de cultura BD, sendo 80% ágar-água e 20% BD (extrato de batata e dextrose – 200 g de batata, 20 g de dextrose, 1000 mL de água destilada). Utilizaram-se placas de Petri (9 cm de diâmetro). O meio de cultura foi coberto, assepticamente, com um disco de papel celofane semipermeável, esterilizado (120°C/40 minutos) e discos de 16 mm de meio de cultura contendo micélios e esporos dos isolados de trichoderma, transferidos para o centro das placas. As placas dos tratamentos controle foram cobertas com o disco de papel celofane, mas não receberam o disco de micélio e esporos dos isolados. As placas foram vedadas com filme de PVC e as culturas mantidas em câmara climática Biosystem Organized Development (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

Após o período de incubação, em condições assépticas, as placas de Petri foram abertas e retirada o papel celofane juntamente com os discos de micélios e esporos, permanecendo no meio de cultura apenas os metabólitos não voláteis sintetizado pelos isolados, onde foram as sementes foram semeados. A desinfestação ocorreu através da exposição das sementes a 10 minutos em hipoclorito de sódio 1%.

A avaliação da germinação final ocorreu ao vigésimo oitavo dia após o início

do experimento. Os valores foram expostos em porcentagem de sementes germinadas.

Tratamento		
Com Pré-Tratamento	Sem Pré-Tratamento	Descrição dos tratamentos
T1	T10	Isolado de <i>trichoderma</i> 2B2
T2	T11	Isolado de <i>trichoderma</i> C1
T3	T12	Isolado de <i>trichoderma</i> 2B12
T4	T13	Isolado de <i>trichoderma</i> 2B2 + Bioestimulante Stimulate®
T5	T14	Isolado de <i>trichoderma</i> C1 + Bioestimulante Stimulate®
T6	T15	Isolado de <i>trichoderma</i> 2B12 + Bioestimulante Stimulate®
T7	T16	Bioestimulante Stimulate®
T8	T17	Controle 1- agar-água+ BD
T9	T18	Controle 2 - agar-água

QUADRO 1: Tratamentos constituintes do experimento avaliado o efeito os metabólitos não-voláteis dos isolados de *trichoderma* e o bioestimulante stimulate® na germinação das sementes de *Paspalum notatum*.

Emergência das plântulas de *P. notatum* ex vitro

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, cada parcela experimental constituída por 50 sementes a uma profundidade de 0,5 no substrato, totalizando 200 sementes por tratamento. Em recipientes com a capacidade de 400g. Irrigados diariamente a 30 ml¹/recipiente. Para cálculo do IVE (índice de velocidade de emergência), utilizou-se a fórmula $IVE = E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn$, em que E1, E2... En representam o número de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda,..., última contagem, e N1, N2, ...Nn representam o número de dias da semeadura à primeira, segunda..., última contagem (NAKAGAWA, 1994). A Porcentagem de emergência de

plântulas total foi realizada com o número de plântulas emergidas ao vigésimo oitavo dia. Antes da semeadura as sementes passaram por um processo de desinfecção superficial, que consistiu da imersão das sementes por 10 minutos em hipoclorito de sódio 1%. Foram divididos dezesseis tratamentos (Quadro 1), com e sem pré-tratamento, selecionado em teste anterior. Três isolados de *Trichoderma* spp. (2B2, 2B12, C1), bioestimulante stimulate® e a combinação entre os isolados de *Trichoderma* spp. e o bioestimulante stimulate®, além do controle com pré-tratamento físico e o controle sem pré-tratamento. Para cada variável foi realizada uma análise estatística, os dados em porcentagem, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, teste F e Duncan à probabilidade de 5% de erro, pelo programa estatístico Genes.

Tratamento		
Com Pré-Tratamento	Sem Pré-Tratamento	Descrição dos tratamentos
T1	T9	Isolado de <i>Trichoderma</i> 2B2
T2	T10	Isolado de <i>Trichoderma</i> C1
T3	T11	Isolado de trichoderma 2B12
T4	T12	Isolado de trichoderma 2B2 + Bioestimulante Stimulate®
T5	T13	Isolado de <i>trichoderma</i> C1 + Bioestimulante Stimulate®
T6	T14	Isolado de trichoderma 2B12 + Bioestimulante Stimulate®
T7	T15	Bioestimulante Stimulate®
T8	T16	Controle

QUADRO 2: Tratamentos constituintes do experimento realizado em casa de vegetação onde foi avaliado o efeito de isolados de trichoderma e o bioestimulante stimulate® na emergência das plântulas.

Produção de Massa seca e Análise morfogênica de *P. notatum*

O período de avaliação das características morfogênicas começou em setembro de 2013 e foi encerrado em novembro de 2013. Para avaliações das características morfogênicas, foram escolhidos aleatoriamente 4 perfilhos por tratamento, sendo os mesmos monitorados quanto ao aparecimento e alongamento de folhas e senescência. Este monitoramento era realizado duas vezes por semana. Com base nos dados de campo foram calculadas as taxas de aparecimento (TA_{pF}, folhas/perfilho.dia), alongamento (TA_{IF}, cm/perfilho.dia) e senescência de folhas (TSe_F, cm/perfilho.dia), número de folhas vivas por perfilho (NFV), duração de vida da folha (DVF, dias) e tamanho final da folha (TFF, cm). A análise estatística dos mesmos foi realizada utilizando-se programa estatístico Genes, Também foi realizado o monitoramento da dinâmica de perfilhamento dos diferentes tratamentos ao longo do período de 60 dias. A contagem de perfilhos era realizada a cada 15 dias, computando-se os perfilhos aparecidos a cada intervalo. Os dados de dinâmica de perfilhamento serão apresentados de forma descritivos na forma de gráficos de áreas e serão interpretados juntamente com os dados de massa de parte aérea. Ao final das análises morfogênicas.

Para o peso da massa seca da parte aérea de *P. notatum* foi realizada primeiramente a retirada dos agregados de substrato, e o corte na base do caule, separando-se a parte aérea. As amostras foram pesadas em balança com precisão de 0,001 g e colocadas em estufa à temperatura de 65°C, permanecendo até atingir peso constante, pesado e determinado o peso médio da massa seca por plântula. Ao final foi realizado o calculado da média aritmética por plântula (NAKAGAWA, 1994).

Tratamento	Descrição dos tratamentos
T1	Isolado de trichoderma 2B12 com mudas oriundas de sementes com pré-tratamento
T2	Bioestimulante Stimulate® com mudas oriundas de sementes com pré-tratamento
T3	Controle com mudas oriundas de sementes com pré-tratamento
T4	Isolado de trichoderma 2B12 com mudas oriundas de sementes sem pré-tratamento
T5	Bioestimulante Stimulate® com mudas oriundas de sementes sem pré-tratamento
T6	Controle com mudas oriundas de sementes sem pré-tratamento

QUADRO 3: Tratamentos constituintes do experimento realizado em casa de vegetação onde foi avaliado o efeito de isolados de *Trichoderma* e o bioestimulante stimulate® na produção de massa seca, na dinâmica de perfilhamento e na análise da morfogênese das plantas de *Paspalum notatum*.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teste preliminar para determinar o melhor pré-tratamento na germinação das sementes de *P. notatum*, demonstrou que o tratamento exclusão das estruturas de revestimento das sementes lema e pálea apresentou o melhor resultado (Tabela 1), sendo assim, selecionado para os testes seguintes.

Tabela 1. Porcentagem de germinação das sementes de *Paspalum notatum*, submetidas a diferentes Pré-tratamento.

Tratamento	% Germinação
Controle	27,0 b
Nitrato de potássio (KNO ₃)	28,5 ab
Exclusão das estruturas de revestimento da semente	34,5 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey Significativo a 5% de probabilidade de erro.

A porcentagem da germinação das sementes de *P. notatum in vitro*, como pré-análise do desempenho dos tratamentos utilizados no experimento da germinação das sementes *ex vitro*, demonstrou que os tratamentos bioestimulante Stimulate®, (28%), e isolado C1 (28%), obtiveram as maiores porcentagens de sementes germinadas com pré-tratamento, e a combinação do isolado C1 e bioestimulante Stimulate® (14%), sem pré-tratamento (Gráfico 1).

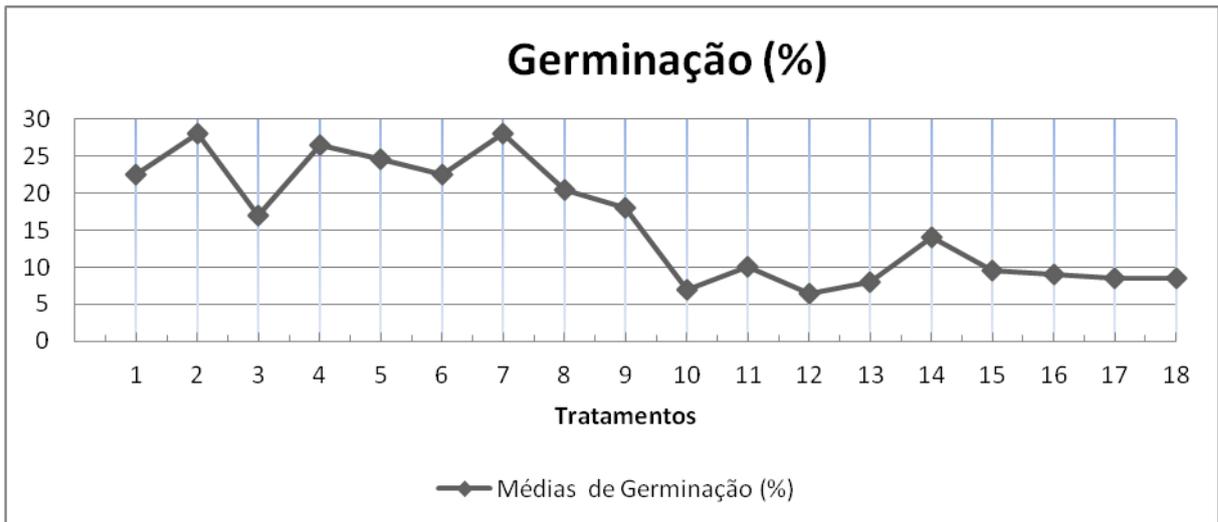


Gráfico 1: Médias dos percentuais de germinação *in vitro* das sementes de *Paspalum notatum*. Desvio Padrão = 7,89.

Os resultados obtidos a partir da análise da emergência e do índice de velocidade de emergência das plântulas de *P. notatum* são apresentados nas Tabelas 2, 3, 4. O pré-tratamento mostrou-se eficiente para a emergência de plântulas, de *P. notatum* (Tabela 2), não havendo interação entre os tratamentos e o pré-tratamento. No entanto, o índice de velocidade de emergência (IVE), demonstrou interação entre os tratamentos e o pré-tratamento. Em virtude das estruturas que revestem o embrião, em gramíneas como glumas, pálea e lema ocasionarem a impermeabilidade em relação às trocas gasosas e a entrada de água, as sementes permanecem dormentes (Bewley & Black, 1982). Maeda & Pereira (1997), observaram que a presença da pálea foi a consequência da dormência das sementes de *Paspalum notatum*, e quando retirada permitiu a promoção da germinação. Ferri (1985) afirma que a entrada de água e gases, é auxiliada através do rompimento dos envoltórios que também permite a lixiviação ou remoção de alguns inibidores presentes no tegumento da semente.

Tabela 2. Porcentagem de emergência de plântulas de *Paspalum notatum* com e sem Pré-tratamento.

	% Emergência
Pré-trat.	
Com Pré-tratamento	51,18 a
Sem Pré-tratamento	42,00 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste F Significativo a 5% de probabilidade de erro.

Embora os resultados para os tratamentos 5, 6 e 7 (pó biológico do isolado C1 de Trichoderma com bioestimulante Stimulate®, 52,5%, combinação do pó biológico do isolado 2B12 de Trichoderma com bioestimulante Stimulate®, 52%, e somente o bioestimulante Stimulate®, 53,25%, respectivamente) tenham apresentado as médias numéricas maiores para a emergência de plântulas de *Paspalum notatum* estas não diferiram significativamente do tratamento 8 controle, 45,5% (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de emergência de plântulas de *P. notatum*, submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento	% Emergência
2B2	32,50 b
C1	37,50 ab
2B12	49,75 ab
2B2 e Stimulate®	49,75 ab
C1 e Stimulate®	52,50 a
2B2 e Stimulate®	52,00 a
Stimulate®	53,20 a
Controle	45,50 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Para o IVE (índice de velocidade emergência), os tratamentos com pré-tratamento 6 (combinação do pó biológico do isolado 2B12 de *Trichoderma* com bioestimulante Stimulate®), 52%, 7 (somente o bioestimulante Stimulate®) e o sem pré-tratamento 12 (combinação do pó biológico do isolado 2B2 de *Trichoderma* com bioestimulante Stimulate®), obtiveram os melhores resultados, com 14.48, 13.93 e 12.75, respectivamente. Diferenciando estatisticamente o tratamento 6 e 7 do tratamento 8 (controle com pré-tratamento), 8.60, e o tratamento 12 do tratamento 16 (controle sem pré-tratamento), 7.29 (Tabela 4). Os resultados obtidos dos tratamentos com o bioestimulante stimulate®, podem estar relacionados ao auxílio na superação da dormência, em função, dos hormônios giberelina e citocinina que compõem o bioestimulante stimulate®, serem listados como um dos vários métodos sugeridos para a dormência estrutural (POPINIGIS, 1977). Metivier (1986), afirma que o hormônio ácido giberélico está envolvido na quebra da dormência e no controle da hidrólise de reservas. No tratamento combinado com isolados de *Trichoderma*, a ação conjunta de ambos, pode ter acelerado o processo de degradação das estruturas que revestem as sementes. Menezes et al. (2009), destaca que o agente biológico *Trichoderma* spp. participa da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas, Assim, apresentando função ecológica. O uso do bioestimulante Stimulate® para índices relacionados a emergência (germinação) e desenvolvimento. De acordo com Vieira (2001), nas culturas de feijão, arroz e milho, apresentou resultados significativos. Cobucci et al. (2005), trabalhando com o feijoeiro em três experimentos, demonstraram que, aplicado nas fases fisiológicas R5 e R7, proporcionou aumento significativo na produtividade, independentemente do cultivo utilizado (convencional ou direto). Em outro experimento realizado com alfafa em casa de vegetação durante período de inverno, a aplicação de ácido giberélico a 5 mg.L⁻¹, uma semana após o corte da alfafa, promoveu aumento de 26% no peso seco da parte aérea da planta, onde nesta mesma concentração, obteve-se redução de 31% no requerimento de água pelas plantas (CAMARGO, 1992). O desempenho do bioestimulante stimulate® apesar de apresentar os maiores valores percentuais em relação à emergência, para o índice de velocidade de emergência foi o qual demonstrou eficiência como promotor em combinação com o pó biológico do isolado 2B12 de *Trichoderma* e sozinho. O comportamento dos isolados de *Trichoderma* spp. foi variado, o que pode estar relacionado as

características específicas de cada um, no desenvolvimento dos mecanismos de ação, que possivelmente explica as diferenças observadas no desempenho dos isolados.

Tabela 4. Índice de velocidade de emergência (IVE) das sementes de *P. notatum*, submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento	Pré- tratamento	
	Sem	Com
2B2	d 3.58 A	d 5.11 A
C1	d 3.41 B	bc 8.89 A
2B12	cd 5.24 B	ab 11.64 A
2B2 e Stimulate®	a 12.75 A	cd 6.42 B
C1 e Stimulate®	abc 8.75 A	ab 10.26 A
2B12 e Stimulate®	ab 11.23 A	a 14.48 A
Stimulate®	ab 12.19 A	a 13.93 A
Controle	bcd 7.29 A	bc 8.60 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente pelo teste Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Em relação à produção de massa seca da parte aérea de plantas de *P. notatum*, os tratamentos 2 (tratamento Bioestimulante Stimulate® com mudas oriundas de sementes com pré-tratamento), média 11.34 g.planta⁻¹, e 5 (Bioestimulante Stimulate® + mudas oriundas de sementes sem pré-tratamento) média 11.29 g.planta⁻¹, diferiram estatisticamente dos tratamentos 3 e 6 (tratamento controle com as mudas oriundas de sementes, com e sem pré-tratamento, respectivamente), que apresentaram médias 9.36 e 8.30 g.planta⁻¹, respectivamente (Tabela 5). De-Polli et al. (1996), destaca que a produção de massa seca por *P. notatum* no sistema solo como cobertura vegetal auxilia a redução das perdas de água por evaporação, e no controle da erosão. Vieira (2001) e Cobucci et al. (2005), trabalhando com o bioestimulante Stimulate® nas culturas de feijão, arroz e milho, apresentaram resultados expressivos, dessa forma, semelhante ao atual trabalho.

Tabela 5: Médias da Produção de Massa seca (g.planta^{-1}) da parte aérea de plantas de *Paspalum notatum*.

Tratamento	Massa Seca da Parte Aérea em (g.planta^{-1})
2B12 (Pré-tratamento)	9.61 bc
Stimulate® (Pré-tratamento)	11.34 a
Controle (Pré-tratamento)	9.36 c
2B12	9.73 abc
Stimulate®	11.29 ab
Controle	8.30 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey Significativo a 5% de probabilidade de erro.

Na correlação o efeito direto das variáveis sobre a variável massa seca da parte aérea (MSPA), pode ser observado na tabela 7. A taxa de alongamento inicial da folha (TAIF) mostrou efeito significativo positivo a variável massa seca da parte aérea, que representa o quanto maior for a taxa de alongamento inicial da folha proporcionalmente a massa seca da parte aérea também será maior. Porém, as variáveis número de folhas vivas por perfilho (NFV), taxas de aparecimento de folha (TApF), e Filocrono demonstraram efeito significativo negativo a variável massa seca da parte aérea, que representa o quanto maior for o número de folhas vivas por perfilho (NFV), taxas de aparecimento de folha (TApF), e Filocrono, proporcionalmente a massa seca da parte aérea será menor. Na correlação, a variável pode não ter um efeito direto significativo, porém se discriminada o efeito indireto via as demais variáveis, esta interação total com a variável (MSPA) pode vir a ser significativa. Com isso, podemos afirmar que a morfogênese fornece informações detalhadas do crescimento vegetal, pois avalia a taxa de aparecimento de novos órgãos, suas taxas de expansão e de senescência (Chapman e Lemaire, 1993). Assim, por meio do seu estudo é possível entender o desenvolvimento das plantas sob diferentes condições de meio e/ou manejo, fazendo-se o mesmo importante para esta espécie pelas poucas informações com este enfoque na literatura, visando, assim, gerar dados que permitam planejar estratégias de

tratamento de semente para melhor germinação.

Tabela 6: Coeficientes de correlação simples de Pearson entre os caracteres massa seca da parte aérea (MSPA), tamanho final da folha (TFF), taxas de aparecimento (TApF), taxa de alongamento inicial da folha (TAIF), Filocrono, senescência de folhas (TSeF), duração de vida da folha (DVF) e número de folhas vivas por perfilho (NFV).

	MSPA	TFF	TApF	TAIF	Filocrono	TSeD	DVF	NFV
MSPA	1	0,01	-0,41*	0,87*	-0,45 *	-0,15	-0,14	-0,59*
TFF		1	-0,48*	-0.19	-0.05	-0.26	0.86*	-0.23
TApF			1	-0.07	-0.13	-0.03	-0.31	0.74*
TAIF				1	-0.60*	-0.25	-0.28	-0.28
Filocrono					1	-0.05	0.13	-0.01
TSeD						1	-0.48*	-0.21
DVF							1	-0.03
NFV								1

*Significativo a 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

Na interpretação dos gráficos de dinâmica de perfilhamento. O tratamento 5 (Bioestimulante Stimulate® com mudas oriundas de sementes sem pré-tratamento) houve maior número de perfilhos, sendo que apareceu mais perfilhos aos 30 dias. Nos tratamentos 2; 4 e 6 (Bioestimulante Stimulate® com mudas oriundas de sementes com pré-tratamento; Isolado de *Trichoderma* 2B12 sem pré-tratamento e Controle sem pré-tratamento) também houve maior perfilhamento aos 30 dias. Os tratamentos 4; 5 e 6 perfilharam pouco entre 45 e 60 dias. Já os tratamentos 1 (Isolado de *Trichoderma* 2B12 com mudas oriundas de sementes com pré-tratamento) ; 2 e 3 (Controle com mudas oriundas de sementes sem pré-tratamento) apresentaram distribuição mais uniforme de perfilhos ao longo dos 60 dias. Há uma relação entre número de perfilhos e massa de parte aérea, logo espera-se que o tratamento 5 apresente maior massa de parte aérea. O fato do tratamento 2 ter apresentado um pouco menos de perfilhos mas ter apresentado maior massa não diferindo do tratamento 5 pode ser explicado pela relação de compensação tamanho-densidade, ou seja, se o número de perfilhos foi menor, estes perfilhos eram maiores o que proporcionou maior massa a este tratamento. Também se

observa que os tratamentos 1; 3; 4 e 6 foram os que apresentaram menor massa de parte aérea (Tabela 5), o que vem de encontro ao menor perfilhamento observado nestes tratamentos como ilustrado na figura 1.

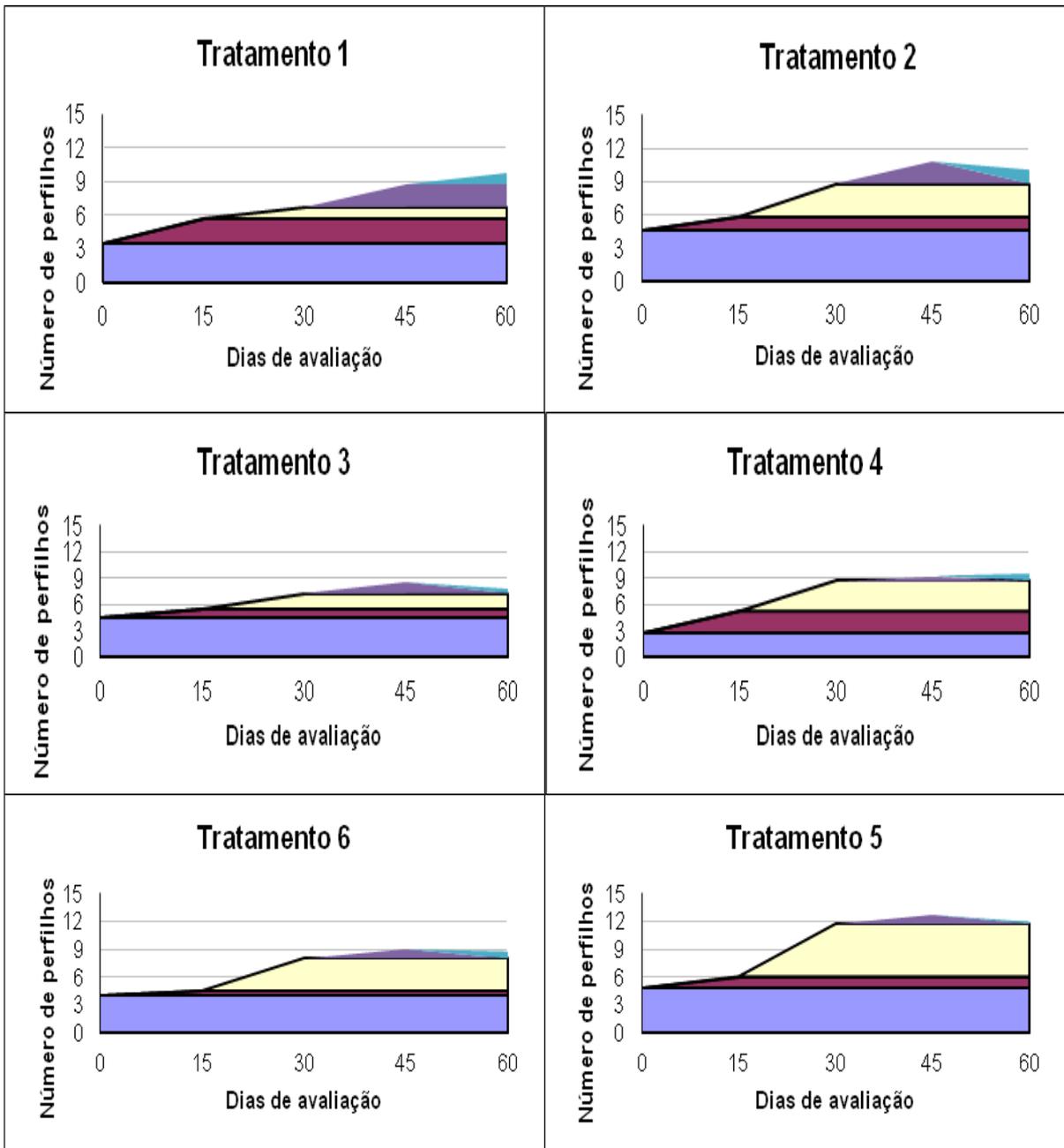


Figura 1: Dinâmica de perfilhamento do *Paspalum notatum* ao longo de 60 dias de avaliação sob diferentes tratamentos.

CONCLUSÃO

O pré-tratamento com a retirada das estruturas que revestem as sementes é eficaz para a germinação.

O bioestimulante stimulate® composto por uma combinação de hormônios, promove o índice de velocidade de emergência.

A presença do agente biológico de isolados de *Trichoderma* não interferiu na promoção do índice de velocidade de emergência das sementes de *Paspalum notatum*, quando combinados com o bioestimulante stimulate®.

A presença do bioestimulante stimulate® auxilia a produção de massa seca e na dinâmica do perfilhamento. A taxa de alongamento inicial da folha (TAIF) interfere positivamente, e o número de folhas vivas por perfilho (NFV), taxas de aparecimento de folha (TApF), e Filocrono interferem negativamente na massa seca da parte aérea.

REFERÊNCIAS

ALTAMORE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p.2926- 2933, 1999.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: viability, dormancy and environmental control**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. v.2, 375p.

BINKOWSKI, P. **Conflitos ambientais e significados sociais em torno da expansão da silvicultura de eucalipto na “Metade Sul” do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Ciências Econômicas, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Rural, Porto Alegre, 2009.

BOLDRINI, I.I.; FERREIRA, P.M.A.; ANDRADE, B.O.; SCHNEIDER, A.A.; SETUBAL, R.B.; TREVISAN, R. E FREITAS, E.M. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre, Ed. Palotti, 64 p. 2010.

CAMARGO, A. C. **Efeitos do ácido giberélico no crescimento invernal de dois cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.), sob condições de casa de vegetação 1990-1992**. 1992. 180 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociência Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 1992.

CHAPMAN, D.F., LEMAIRE, G. Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 1993, Austrália, 17. **Proceedings...** ed., p.95-104.

COBUCCI, T.; WRUCK, F.J.; SILVA, J.G. Resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) as aplicações de bioestimulante e complexos nutritivos. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia. **Resumos...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. v.2, p.1078-1081.

DE-POLLI, H. & GUERRA, J.G.M. Biomassa microbiana: Perspectivas para o uso e manejo do solo. In: ALVAREZ V., V.H.; FONTES, L.E.F. & FONTES, M.P.F. (eds). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Universidade Federal de Viçosa, 1996. p.551-564.

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

FACHINETTO JM, BAGATINI MD, DURIGON J, SILVA ACF, TEDESCO SB. 2007. **Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*.** *Rev Bras Farmacogn* 17: 49-54.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação do básico ao aplicado.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 209-222.

FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal 1** . 2. ed., São Paulo: EPU, 1985.362 p.

FIDALSKI, J.; MARUR, C. J.; AULER, P. A. M.; TORMENA, C. A. Produção de laranja com plantas de cobertura permanente na entrelinha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 927-935, 2006.

IBGE 2004. Mapa da vegetação do Brasil e Mapa de Biomas do Brasil.

MAEDA, J.A.; PEREIRA, M. de F.D.A.C.; MEDINA, P.F. Conservação e superação da dormência de sementes de *Paspalum notatum* Flügge. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.2, p.165-171,1997.

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

MARASCHIN G E Novas perspectivas de avaliação de pastagens. In: XXXVI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Simpósio sobre novas técnicas de avaliação de forrageiras e pastagens, 36, 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre:SBZ, 1999. p.321-332.

METIVIER, J. R. Citocininas e giberelinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal.** 2ed. São Paulo: EDUSP, 1986. v.2, p.93-162.

MENEZES, J.P.; JUNGES, E.; BLUME, E.; PEREIRA, M.E. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da FZVA**, v.17, n.1, p.38-50, 2010.

NABINGER, C. Eficiência do uso de pastagens: disponibilidade e perdas de

forragem. In: FUNDAMENTOS DO PASTEJO ROTACIONADO. Simpósio sobre manejo da pastagem, 14, 1997. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:FEALQ, 1997. p.213- 251.

NACHTIGAL, G.F. **Espécies de *Trichoderma*: fungos benéficos a serem favorecidos por práticas adequadas de manejo.** 2012. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2012_1/Trichoderma/index.htm>. Acesso em: 16/10/2013.

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

OLIVA, M. A.; FIGUEIREDO, J. G. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 2, p. 389-397, 2005.

PESKE, S.T.; BOYD, A.H. Beneficiamento de sementes de capim pensacola (*Paspalum notatum* Flüggé). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília. v.2, n.2, p.39-56, 1980.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: Vem Cruz, 1977.289 p.

VALLS, J.F.M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE PASPALUM, 1987, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987. p.3-13.

VIEIRA, E.L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glicine max*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.).** 2001. 122f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal São Paulo, Piracicaba.

VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine Max* L. Merrill).** Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 74p.

DISCUSSÃO

O teste de *Allium cepa* baseado na análise do número total e o número de células nas diferentes fases do ciclo celular, obtidas a partir de pontas de raízes de cebola tratadas com metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. proporcionou a seleção dos três isolados 2B2, 2B12 e C1 de trichoderma que apresentaram os menores números de células em interfase e os maiores para as fases prófase, metáfase, anáfase e telófase e alcançaram os maiores índices mitóticos (IM) com ($\chi^2= 5.45 \alpha= 0.05$), ($\chi^2= 5.0 \alpha= 0.05$) e ($\chi^2= 3.92 \alpha= 0.05$) (Artigo 1) (Tabela 2), respectivamente. Através dos seus metabolitos os isolados 2B22, TSM1, TSM2, produto Trichodermil® e o produto Agrotrich® não apresentaram diferenças significativas aos controles, assim, não promovendo a divisão celular em pontas de raízes. O resultado demonstra que a habilidade de aumentar o índice mitótico é variável entre os isolados estudados.

Conforme Chauhan et al.(1999) os testes têm apresentado efeitos parecidos em plantas e mamíferos. Servindo como estudo para avaliar o desempenho de bioagente. O gênero trichoderma, bioagente estudado, em função da capacidade de produzir metabólitos, conseqüentemente induz a multiplicação celular, que pode promover o crescimento de plantas (ALTAMORE et al., 1999).

Os isolados desenvolvem a produção metabólica de maneira variável, demonstrando haver diferença no comportamento entre os isolados em relação à síntese metabólica. Os isolados com potencial de produção metabólica neste estudo se adaptaram melhor ao meio de crescimento líquido, possibilitando o efeito promotor da divisão celular.

A seleção *in vitro* e *ex vitro* dos isolados de trichoderma como bioagente com capacidade para a promoção de crescimento, utilizando o teste de *A. cepa* poderá vir a ser a uma ferramenta alternativa, e evidencia a necessidade de mais trabalhos de pesquisa nesse campo de estudo.

No estudo da sanidade das sementes de *P. notatum*, os métodos de papel de filtro e plaqueamento em meio de cultura BDA possibilitaram a identificação e frequência dos gêneros fúngicos associados às sementes. Pelo método de papel de filtro foram identificados os gêneros *Curvularia*, *Fusarium* e *Geniculosporium*, o método de plaqueamento em meio de cultura BDA, além destes três, foi observado o

gênero *Aspergillus*. As informações sobre a sanidade das sementes podem ser utilizadas, para a definição de tratamentos prévios de controle, e como levantamento dos danos que as possíveis doenças podem causar às sementes e às mudas (BOTELHO et al., 2008). Além disso, outro fator é o número reduzido de trabalhos sobre o assunto em espécies nativas, principalmente do bioma Pampa, como do *P. notatum*, assim, tornando as informações sobre a associação patógeno-semente de grande valor para trabalhos futuros.

Desenvolvendo mecanismos de antagonismo, o gênero trichoderma através do isolado 2B2 demonstrou ser eficiente na confrontação direta aos três gêneros de fungos com maior frequência nas sementes de *P. notatum* (Artigo 2) (Tabela 2). Possivelmente, houve nos isolados de trichoderma, diferenças funcionais que possibilitaram o desenvolvimento de mecanismos de ação, permitindo o melhor desempenho do isolado 2B2 em relação ao demais. Os isolados de *Trichoderma* spp. além da antibiose, demonstraram que possuem outras habilidades como agentes de biocontrole. Conforme Bettioli (1991), afirma que a habilidade de combinar diferentes mecanismos de ação como antibiose, parasitismo, competição e estímulo à defesa do hospedeiro é uma característica importante que o antagonista possua. Santos (2008) indica que espécies de trichoderma podem vir a desempenhar mecanismos de ação simultâneos, por possuírem a habilidade de inibir a ação de fitopatógenos, que podem interferir no desenvolvimento normal da planta.

A exclusão das estruturas de revestimento das sementes de *Paspalum notatum* lema e pálea foi o pré-tratamento que apresentou o melhor desempenho para a germinação das sementes (Artigo 3) (Tabela 1). Sendo assim, selecionado para os testes seguintes. Bewley & Black (1982), afirmam que a presença das estruturas que revestem o embrião impede às trocas gasosas e a entrada de água, fato confirmado por Maeda & Pereira (1997), que observaram na presença da pálea uma das causas da dormência das sementes de *Paspalum notatum*.

Para a germinação de sementes de *Paspalum notatum* em casa de vegetação não houve diferença significativa dos tratamentos com a presença do pó biológico do isolado de trichoderma e do bioestimulante Stimulate® que apresentaram as maiores médias numéricas do tratamento controle (Artigo 3) (Tabela 3). O IVE (índice de velocidade emergência), os tratamentos com pré-tratamento na combinação do pó biológico do isolado 2B12 de trichoderma com bioestimulante

Stimulate®, somente o bioestimulante Stimulate® e o sem pré-tratamento a combinação do pó biológico do isolado 2B2 de trichoderma com bioestimulante Stimulate®, diferiram estatisticamente do controle com pré-tratamento, e sem pré-tratamento (Tabela 4). A superação da dormência pode ter sido o motivo do bom desempenho dos tratamentos com o bioestimulante stimulate®, pelo fato, dos hormônios giberelina e citocinina que compõem o bioestimulante stimulate®, serem listados como um dos vários métodos sugeridos para a dormência estrutural (POPINIGIS, 1977). O Stimulate® para a germinação, de acordo com Vieira (2001), apresentou resultados significativos na promoção da germinação das sementes em feijão, arroz e milho. No tratamento combinado com isolados de trichoderma, a ação conjunta de ambos, pode ter acelerado o processo de degradação das estruturas que revestem as sementes. Menezes et al. (2009), destaca que o agente biológico *Trichoderma* spp. participa da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas.

Em relação à produção de massa seca da parte aérea de plantas de *Paspalum notatum*, os tratamento com a presença do Stimulate® apresentaram os melhores desempenho, diferindo estatisticamente dos tratamentos Controle (Tabela 5). Em alfafa, aplicação de ácido giberélico a 5 mg.L^{-1} em casa de vegetação promoveu o aumento de 26% no peso seco da parte aérea da planta (CAMARGO, 1992).

A massa seca da parte aérea o seu ganho é proporcional a taxa de alongamento inicial da folha (TAIF). Folhas vivas por perfilho (NFV), taxa de aparecimento de folha (TApF), e Filocrono, o ganho da massa seca da parte aérea é inversamente proporcional. Na dinâmica do perfilhamento o tratamento com a presença do Bioestimulante Stimulate® com mudas oriundas de sementes sem pré-tratamento mostrou melhor desempenho, sendo que apareceu mais perfilhos aos 30 dias. Este resultou confirma a relação entre número de perfilhos e massa de parte área, logo o tratamento 5 (Bioestimulante Stimulate® com mudas oriundas de sementes sem pré-tratamento) apresenta maior massa de parte aérea.

CONCLUSÃO

O teste em pontas de raízes de *Allium cepa* demonstra ser eficiente para a seleção de isolados de *Trichoderma* spp. que aumentam o índice mitótico de células de pontas de raízes de *A. cepa*, pela ação de metabólitos. Há variabilidade entre os isolados estudados com relação à capacidade de aumentar o índice mitótico.

No estudo da sanidade das sementes de *P. notatum*, o método de plaqueamento em meio de cultura BDA identifica microrganismos não detectados pelo método do papel de filtro. Nas sementes de *P. notatum* o gênero de maior frequência encontrado é *Curvularia* sp. e o isolado 2B2 é eficiente no confronto aos principais gêneros de fungos associados às sementes de *P. notatum*.

O pré-tratamento com a retirada das estruturas (lema e pálea) que revestem as sementes aumenta a porcentagem de germinação das sementes de *P. notatum*. O bioestimulante stimulate®, promove o índice de velocidade de emergência, e a presença do agente biológico de isolados de trichoderma não interfere na promoção do índice de velocidade de emergência das sementes de *Paspalum notatum*.

A presença do bioestimulante stimulate® é eficiente na produção de massa seca. A taxa de alongamento inicial da folha (TAIF) interfere positivamente, e o número de folhas vivas por perfilho (NFV), taxas de aparecimento de folha (TApF), e Filocrono interferem negativamente na massa seca da parte aérea em plantas de *Paspalum notatum*.

REFERÊNCIAS

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.7, p. 2926-2933, 1999.

ANDRADE, R.V. de. & VAUGHAN, C.E. Avaliação de sementes firmes em pensacola Bahia e milheto. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.2, n.2, p.57-66. 1980.

ARAÚJO, A. A. Principais gramíneas do Rio Grande Do Sul. Porto alegre: Sulina, 1971. 255p.

AVILA, A.L.; ARGENTA, M.S.; MUNIZ, M.F.B.; POLETO, I. E BLUME, E. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga), Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, vol.19, n.1, p. 61-68. 2009.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A, C, F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2007, vol.17, n.3, pp. 444-447.

BARBÉRIO, A.; BARROS, L.; VOLTOLINI, J.C.; MELLO, M.L.S. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 3, p. 837-842, 2009.

BARRETO, I.L. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. 1974. 258 f. dissertação (livre docência-fitotecnia). Faculdade de Agronomia-UFRGS do Rio Grande do Sul, 1974.

BAKER, R. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. **Trends of biotechnology**, v.7, p.34-38, 1989.

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

BATISTA, L.A.R.; GODOY, R. Capacidade de produção de sementes em acessos do gênero *Paspalum*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.5, p.841-847, 1998.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. **Int Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 249-60, Dec., 2004.

BERRETTA, E.J. Ecophysiology and management response of the subtropical grasslands of Southern America. p. 939-946. **Proceedings...19th INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS**. São Pedro, Sao Paulo, Brasil, 11-21. 2001.

BERTOLIN, D. C.; SÁ, M. E. DE; ARF, O.; JUNIOR, E. F.; COLOMBO, A. S.; CARVALHO, F. L. B. M. **Aumento da produtividade de soja com aplicação de bioestimulantes**. Bragantia, vol 69, n. 2. Campinas – SP, 2010.

BITTENCOURT, L.F. E HOMECHIN, M. Avaliação da qualidade sanitária de sementes de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz - Flacourtiaceae) por três métodos de incubação. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.20, n.2, p. 233-236. 1998.

BOLDRINI, I.I. A flora dos Campos do Rio Grande do Sul. In: Pillar, V. P.; Müller, S. C.; Castilhos, Z. M. S. e Jacques, A. V. A. (Eds.) - **Campos Sulinos**. Brasília, MMA, p. 63-77. 2009.

BOLDRINI, I.I.; FERREIRA, P.M.A.; ANDRADE, B.O.; SCHNEIDER, A.A.; SETUBAL, R.B.; TREVISAN, R. E FREITAS, E.M. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre, Ed. Palotti, 64 p. 2010.

BOTELHO, B. A.; PEREZ, S. C. J. G. A. **Estresse hídrico e reguladores de crescimento na germinação de sementes de canafístula**. Revista Scientia Agricola, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 43-49, jan./mar. 2001.

BRASIL - Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Minas Gerais: Delrey Gráfica e Editora. 40p. 2000.

CAMPAROTO ML, TEIXEIRA RO, MANTOVANI MS, VICENTINI VEP. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genet Mol Biol** 25: 85-89. 2002.

CARRERAS-VILLASEÑOR, N.; SÁNCHEZ-ARREGUÍN, J. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. H. Trichoderma: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 3-16, Jan., 2012.

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

CASTRO, P. R. C.; MELOTO, E. Bioestimulante e hormônios aplicados via foliar, In: BOARETO, A.E.; ROSOLEM, C. A. (Eds.). **Adubação foliar**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. v.1, p. 191-235.

CASTRO, P.R.C.; PACHECO, A.C.; MEDINA, C.L. Efeitos de Stimulate® e de microcitros no desenvolvimento vegetativo e na produtividade da laranjeira 'pêra' (*Citrus sinenses* L. osbeck). **Scientia Agricola**, vol. 55, n. 2. Piracicaba-SP, 1998.

CASTRO, P.R.C.; VIEIRA, E.L. Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical. **Guaíba: Agropecuária**, 2001. 132p.

CAMARGO, A. C. **Efeitos do ácido giberélico no crescimento invernal de dois cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.), sob condições de casa de vegetação 1990-1992**. 1992. 180 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociência Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 1992.

CHAER, G.M. E TÓTOLA, M.R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol.31, n.6, p. 1381-1396. 2007.

CHAPMAN, D.F., LEMAIRE, G. Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 1993, Austrália, 17. **Proceedings...** ed., p.95-104.

CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: Les antagonismes microbiens. Mode d'action et application à la lutte biologique controle les maladies des plantes. **Colloques de L'I.N.R.A.**, v.18, p.35-40, 1983.

COBUCCI, T.; WRUCK, F.J.; SILVA, J.G. Resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) as aplicações de bioestimulante e complexos nutritivos. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia. **Resumos...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. v.2, p.1078-1081.

COSTA, J.A.A. **Características ecológicas de ecótipos de *Paspalum notatum* Flüge var. *notatum* naturais do Rio Grande do Sul e ajuste de um modelo de estimação do rendimento potencial.** Porto Alegre: UFRGS, 1997. 99 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, UFRGS, 1997.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R. antifungal alkil- pyrones produced by *trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, pt-4, p.503-513, 1987.

CLERGUE B.; AMIAUD B.; PERVANCON F.; LASSERRE-JOULIN, F. E PLANTUREUX, S. Biodiversity: function and assessment in agricultural areas. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, vol.25, n.1, p. 1-15. 2005.
DAHMER N., SCHIFINO-WITTMANN M.T. & DALL'AGNOL M. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flüge accessions. **Scientia Agricola**. 65: 381-388. 2008.

DAILY G.C. E EHRLICH P.R. Global change and human susceptibility to disease. **Annual Review of Energy and Environment**, vol.21, p. 125-144. 1996.
DAVIES, P.J. Plant hormones and their role in plant growth and development. New York, **Martin Nijhoff Publ.**:1987.

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

ESPINDOLA, J.A.A.; ALMEIDA, D.L. de; GUERRA, J.G.M.; SILVA, E.M.R. da & SOUZA, F.A. de. Influência da adubação verde na colonização micorrízica e na produção da batata-doce. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.33, p.339-347, 1998.

EL-SHAHABY AO, ABDEL MIGID HM, SOLIMAN MI, MASHALY IA. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. **Pak J Biol Sci** 6: 23-28. 2003.

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

FACHINETTO JM, BAGATINI MD, DURIGON J, SILVA ACF, TEDESCO SB. 2007. **Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*.** *Rev Bras Farmacogn* 17: 49-54.

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.

FIGUEIRÓ, A. S.; SELL, J. C. **O Bioma Pampa e o Modelo de Desenvolvimento em Implantação no Alto Camaquã**. VI Seminário Latino Americano de Geografia Física, II Seminário Ibero Americano de Geografia Física. Universidade de Coimbra, Maio de 2010.

FRANKE, L. B.; NABINGER, C. Avaliação da germinação de sementes de seis acessos de *Paspalum notatum* Flüge, nativos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, p. 102 – 107, 1996.

FONTANA C.S.; BENCKE G.A. E REIS R.E. **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 632 p. 2003.

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

GADANO A, GURNI A, LÓPEZ P, FERRARO G, CARBALLO M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*.L. **J Ethnopharmacol** 81: 11-16. 2002.

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

HASENACK, H.; CORDEIRO, J.L.P. & COSTA, B.S.C. **Cobertura vegetal atual do Rio Grande do Sul**. In: DALL'AGNOL, M.; NABINGER, C.; SANT'ANNA, D.M. & SANTOS, R.J. (eds.). II Simpósio de Forrageiras e Produção Animal. Depto. Forrageiras e Agrometeorologia/UFRGS, Porto Alegre. Pp. 15-21. 2007.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. New York: Heywood, 1985. 335p.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology**. 2.ed. New York: John Wiley, 1999. 512 p.

IBGE. 2006. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo Agropecuário de 1995-1996. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 11 dez. 2013.

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

LOPES, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. 2009.

LUCON, C. M. M. **Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp.** 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm>. Acesso em 29 out 2013.

LUZ, L. V. **Caracterização citogenética e de crescimento de *Schinus terebinthifolius* Raddi.** 2013. Dissertação de mestrado. Santa Maria, Universidade federal de Santa Maria, 107 p., 2013.

NAGAO, M. A.; RUBENSTEIN. Relationship of cytokinin to lateral bud growth at early stages after decaptacion. **Bot. Gaz.** V.136, p.366-371, 1975.

NEERGAARD, P. Incubation tests. In: **Seed Pathology**. London: Macmillan Press, 1977, 839p.

NIMER, E. Clima. In: IBGE (Ed.) - **Geografia do Brasil. Região Sul**. Rio de Janeiro, IBGE, p. 35-79. 1977.

MACHADO, Daniele Franco Martins et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, jun. 2012. Disponível em <http://www.scielo.gpeari.mctes.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2012000100026&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 07 jan. 2014.

MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M. E PAGLIA, A.P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, vol 2**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 908 p. 2008.

MAEDA, J.A.; PEREIRA, M. DE F.D.A. Caracterização, beneficiamento e germinação de sementes de *Paspalum notatum* Flugge. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, p.100-105, 1997.

MARRIOTT, C.A.; FOTHERGILL, M.; JEANGROS, B.; SCOTTON, M. E LOUAULT, F. Long term impacts of extensification of grassland management on biodiversity and productivity in upland area. A review. **Agronomie**, vol.24, n.8, p. 447-461. 2004.

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.

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

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

MIKICH, S.B. E BÉRNILS, R.S. **Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná**. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná, 763 p. 2004.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; COLLIVIGNARELLI, C.; GUZZELA, L.; ZERBINI, I.; BERTANZA, G.E.; PEDRAZZANI, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, Londres, v. 34, n.17, p. 4261-4269, 2000.

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

OLIVEIRA, F.C. **Conservação de sementes de Eugenia uniflora Lam. e Inga vera Penn.: qualidade sanitária e taxas respiratórias**. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, Brasil, 58 p. 2011.

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D.; SANTOS, S.O. Efeito de fitorreguladores sobre o desenvolvimento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Carioca. **Revista Biociências**, Taubaté, v.5, n.1, p.7-13, 1999.

PAPAVIZAS, G. C. ***Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol**. Ann. Rev. Phytopathol 23: 23-54, 1985.

PIZARRO, E.A. Potencial forrajero del género *Paspalum*. **Pastura Tropicales**, v.22, n.1, p.38-45, 2000.

POLOP, J.; CALDERÓN, G.; FEUILLADE, M.R.; GARCÍA, J.; ENRIA, D. E SABATTINI M. Spatial variation in abundance of the junin virus hosts in endemic and nonendemic Argentine haemorrhagic fever zones. **Austral Ecology**, vol.32, n.3, p. 245-253. 2007.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Vera Cruz, 1977. 289p.

PREVIERO, C. A.; GROTH, D.; SOAVE, J. Sobrevivência de *Drechslera* spp. em sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf armazenadas em ambiente natural. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, p. 148 – 154, 1999.

RAVEN P. H. **Biologia Vegetal** 6. ed Rio de Janeiro, RJ: Guanabara 2001.
RIDOUT, C.J.; COLEY-SMITH, J.R.; LYNCH, J.M. Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p. 180-187, 1988.

ROESCH, L.F.W.; VIEIRA, F.C.B.; PEREIRA, V.A.; SCHÜNEMANN, A.L.; TEIXEIRA, I.F.; SENNA, A.J.T.; STEFENON, V.M. The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. **Diversity**, vol.1, n.2, p. 182-198. 2009.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. **Mycological Research**. 100: 923-935. 1996.

SARMENTO, M.B. E VILLELA, F.A. Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil. **Informativo ABRATES**, 20, vol.1, n.2, p. 39-44. 2010.

SANTOS, A. B. **Morfogênese de gramíneas nativas do rio grande do sul (Brasil) submetidas a pastoreio rotativo**. 2012. Dissertação de mestrado. Santa Maria, Universidade federal de Santa Maria, 84 p., 2012.

SANTOS, C. M. G. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas e crescimento do algodoeiro**. 2004. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

SAMUELS, G. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, Feb., 2006.

SHIPPINDALL, L.K.A.; SCOTT, J.D.; THIRON, J.J. & MEREDITH, D. **The grasses and pastures of South Africa**. New York: Meredith, 1955. 771p.

STEINER, M.G. **Caracterização agronômica, molecular e morfológica de acessos de *Paspalum notatum* Flugge e *Paspalum guenoarum* Arech**. 2005. 137f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

STOWE, B. B.; YAMAKI, T. The history and physiological action of the gibberellins. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, California, 8, p. 181-216, 1957.

SUERTEGARAY, D.M.A. E SILVA, L.A.P. Tchê Pampa: histórias da natureza gaúcha. In: Pillar, V. P.; Müller, S. C.; Castilhos, Z. M. S. e Jacques, A. V. A. **Campos Sulinos**. Brasília, MMA, p. 42-59. 2009.

SRIVASTAVA, R.; KHALID, A.; SINGH, U.S. E SHARMA, A.K. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici for the management of tomato wilt. **Biological Control**, 53, 1: 24-31. 2010.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2. ed Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 792 p.

VALLS, J.F.M. Melhoramento de plantas forrageiras nativas, com ênfase na situação do gênero *Paspalum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo; Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2005.

VALLS, J.F.M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE PASPALUM, 1987, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987. p.3-13.

VALLS, J.F.M. & POZZOBON, M.T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE PASPALUM, 1987, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987. p.3-1.

VERDUM, R. **O pampa. Ainda desconhecido**. Revista do Instituto Humanitas Unisinos - IHU Online. São Leopoldo, agosto de 2006, nº: 183, p.4-9.

VITERBO, A. et al. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 549-56, Aug., 2002.

VIEIRA, E.L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glicine max*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2001. 122f. Tese (Doutorado) -

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal São Paulo, Piracicaba.

WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. **Flora Fanerogâmica Do Estado Do Estado De São Paulo**. São Paulo: instituto de botânica, 2001. 292 p.

WEINDLING, R. Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v.24, p.1153-1179, 1934.

WINDHAM, M.T. et al. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.76, p.518-521, 1986.

APÊNDICES

Apêndice A – Análise da variância para a emergência de plântulas em casa de vegetação.

F.V	G.L	Q. M.
Tratamento	7	469.56 *
Pré-Tratamento	1	1350.56 *
Tratamento x Pré-Tratamento	7	92.13
Resíduo	45	142.27
Média		46.59
C.V		25,59

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

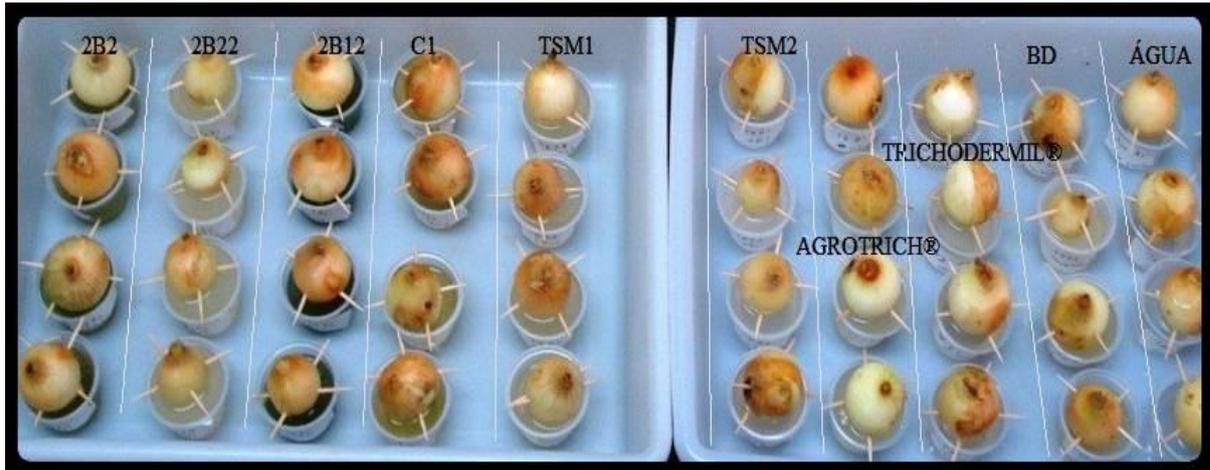
Apêndice B – Análise da variância para o índice de velocidade de emergência em casa de vegetação.

F.V	G.L	Q. M.
Tratamento	7	72,27 *
Pré-Tratamento	1	55,46 *
Tratamento x Pré-Tratamento	7	29,49 *
Resíduo	45	9,03
Média		8,98
C.V		33,43

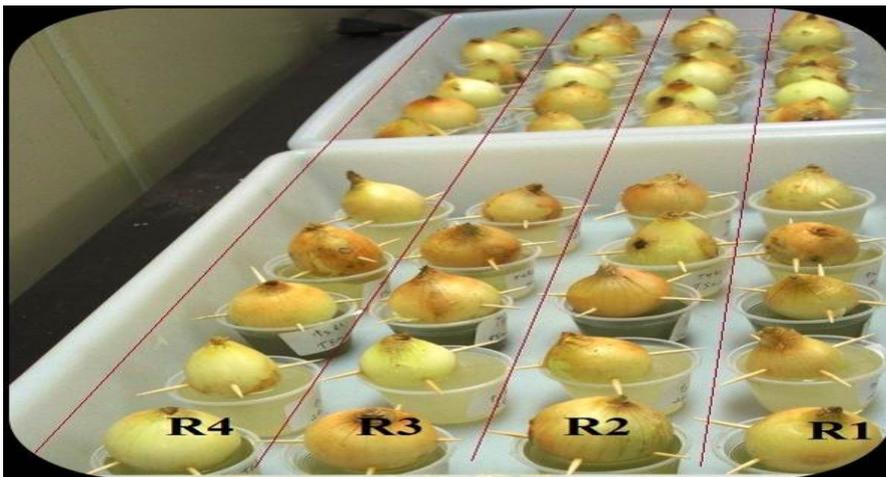
* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXOS

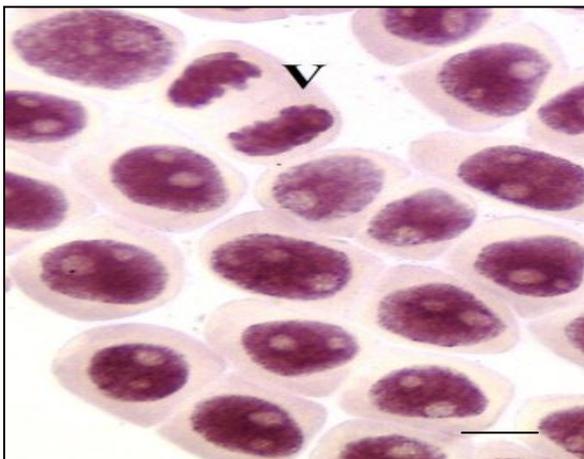
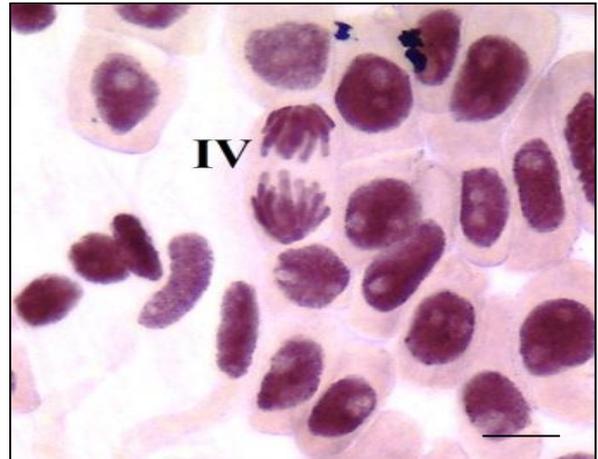
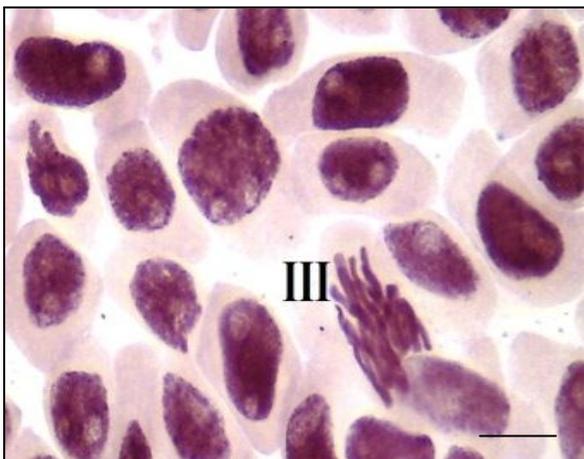
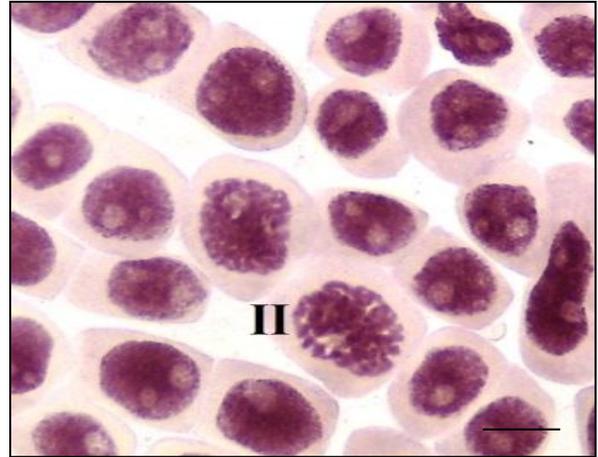
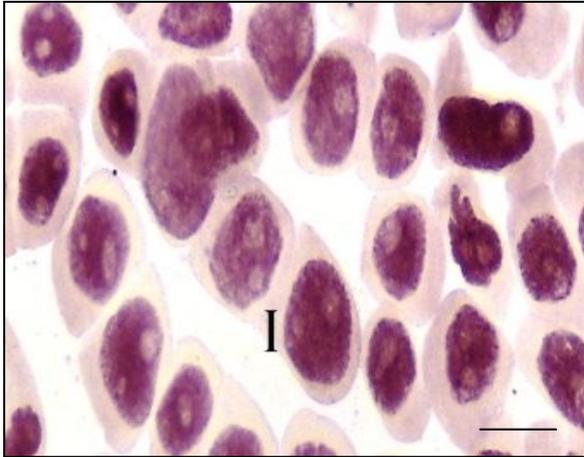
Anexo A – Disposição dos tratamentos no experimento: Efeito de metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. sobre o índice mitótico nas células das pontas de raízes de *Allium cepa*.



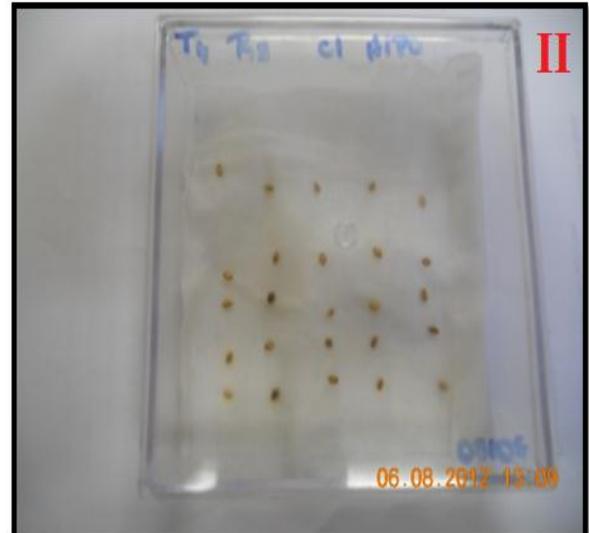
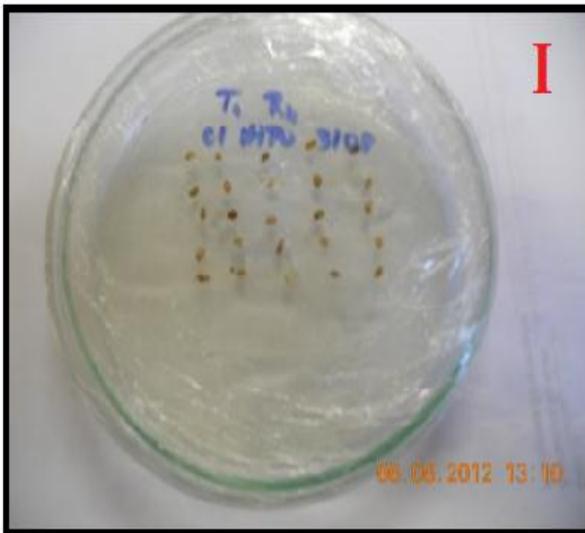
Anexo B – Organização das repetições R1, R2, R3, R4.



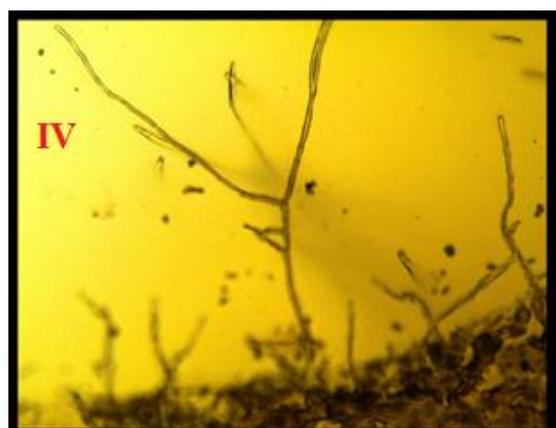
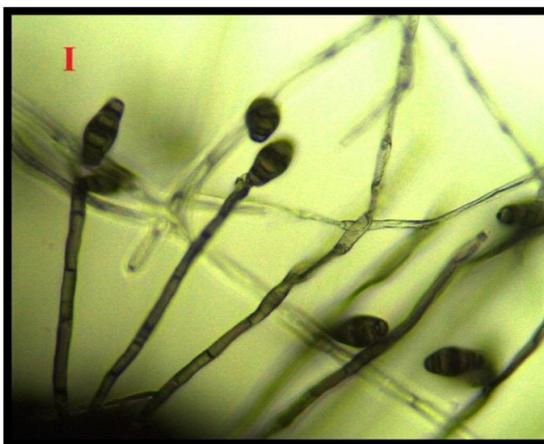
Anexo C – Fase da divisão celular das pontas de raízes de *Allium Cepa* em meio contendo metabólitos de *Trichoderma* spp. (I) Interfase; (II) Prófase; (III) Metáfase; (IV) Anáfase; (V) Telófase. (escala 10 µm)



Anexo D – Método do plaqueamento em meio ágar sólido (I); Método do papel de filtro (II).



Anexo E – Observação das estruturas fúngicas em microscópio óptico e a identificação baseando-se em características morfológicas: (I) *Curvularia* sp.; (II) *Aspergillus* sp.; (III) *Fusarium* sp.; (IV) *Geniculosporium* sp.



Anexo F – (A) inóculo de isolados de trichoderma na forma de pó biológico; (B) inóculo em envelope de papel seco.



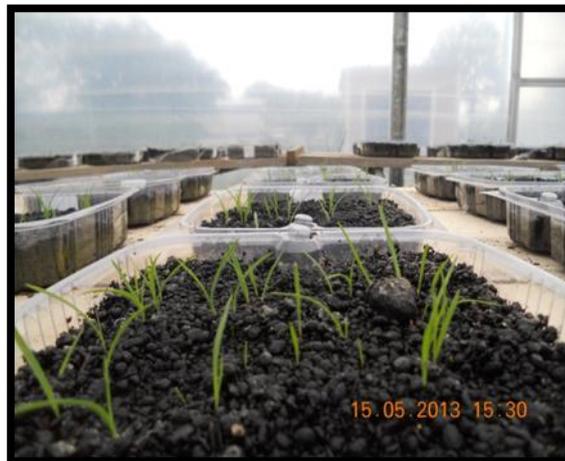
Anexo G – Experimento ex vitro em casa de vegetação. Fase inicial (período de semeadura) (esquerda); Período de emergência de plântula (direita).



Anexo H – Parcela experimental do tratamento controle (esquerda) e tratamento de melhor desempenho (Bioestimulante Stimulate®) (direita).



Anexo I – Desenvolvimento das plântulas de *Paspalum notatum* 15 dias após a emergência.



Anexo J – Plantas de *Paspalum notatum* transplantadas em casa de vegetação para análise morfogênica e produção de biomassa. (abaixo) Parcela experimental destacando o perfilho avaliado.

