



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA, MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA**

Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical

**RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTE DE SANIDADE E
MICROBIOLIZAÇÃO COM *Trichoderma* sp. EM
SEMENTES DE NÍGER (*Guizotia abyssinica*)**

GABRIELA SILVA KLOSTER

CU I A B Á - MT

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA, MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical

RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTE DE SANIDADE E
MICROBIOLIZAÇÃO COM *Trichoderma* sp. EM
SEMENTES DE NÍGER (*Guizotia abyssinica*)

GABRIELA SILVA KLOSTER

Eng^a Agrônoma

ORIENTADOR: Prof^o. Dr^o SEBASTIÃO CARNEIRO GUIMARÃES

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a LEIMI KOBAYASTI

Dissertação apresentada à Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

CUIABÁ - MT

2013

K66r Kloster, Gabriela Silva.

Restrição hídrica em teste de sanidade e microbiolização com *Trichoderma* sp. em sementes de níger (*Guizotia abyssinica*). / Gabriela Silva Kloster. -- 2013
50 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Sebastião Carneiro Guimarães.

Co-orientadora: Leimi Kobayashi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, Cuiabá, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Condicionamento osmótico. 2. Blotter test. 3. Bioprotetores. 4. Tratamento de sementes. 5. *Alternaria* sp.. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTE DE SANIDADE E MICROBIOLIZAÇÃO
COM *Trichoderma* spp. EM SEMENTES DE NÍGER (*Guizotia abyssinica*)

Autora: GABRIELA SILVA KLOSTER

Orientador: Dr. SEBASTIÃO CARNEIRO GUIMARÃES

Aprovada em 26 de abril de 2013.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Sebastião Carneiro Guimarães
(UFMT) (Orientador)

Pro. Dr. Leimi Kobayashi
(UFMT) (Co-orientadora)

Prof. Dr. Rita de Cássia Santos
(UFMT)

Pro. Dr. Maria Aparecida Braga Caneppele
(UFMT)

Aos meus pais, Rosângela e Marco,
e minhas irmãs Aline e Camila,
pela ajuda, apoio,
paciência e compreensão.

DEDICO

Aos meus Avôs Agostinho, Regina, Ney e Nelly.

Minha homenagem

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar e iluminar meu caminho sempre.

À Universidade Federal do Mato Grosso pela formação e orientação profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela bolsa de mestrado.

Ao professor Dr. Sebastião Carneiro Guimarães pela orientação.

A professora Dr^a. Leimi Kobayasti pela ajuda, paciência e orientação.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa.

Aos demais professores da Pós-Graduação em Agricultura Tropical, pelo conhecimento que nos foi passado nesses dois anos, e pela dedicação ao ensino e pesquisa.

Ao seu Tarcício Antonio Gebert, proprietário da fazenda Buriti, pela doação das sementes para o trabalho.

À minha família pelo apoio, carinho e atenção.

Ao meu namorado Lucas, pelo apoio, carinho e compreensão.

Aos meus amigos Pedro, Wininton, Luana, Valdeir, Gilmar, Liliane e Rodrigo.

Aos demais colegas da Pós-Graduação e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Meus agradecimentos a todos, pessoas e instituições, que de alguma forma foram fundamentais na concretização deste mestrado.

RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTE DE SANIDADE E MICROBIOLIZAÇÃO COM *Trichoderma* SP. EM SEMENTES DE NÍGER (*Guizotia abyssinica*)

RESUMO – Níger (*Guizotia abyssinica*) é uma planta oleaginosa, originária da Etiópia, e sua expansão no Brasil demanda sementes de boa qualidade física, fisiológica e sanitária. Em teste de sanidade de sementes é comum a utilização de restritores hídricos para inibir a germinação e evitar contaminação entre as sementes com o meio externo, sendo imperativo que esses tratamentos não interfiram no crescimento dos organismos alvo de avaliação. O uso da técnica da microbiolização das sementes com algumas espécies de *Trichoderma* tem obtido sucesso no controle de fungos e desconhece-se sua eficácia em níger. Com o objetivo de contribuir com informações para o atendimento dessas demandas, realizaram-se dois experimentos em laboratório. No primeiro foi avaliada a eficiência de restritores hídricos na inibição da germinação das sementes para adaptação do método de incubação em papel de filtro no teste de sanidade. No segundo foi avaliada a eficiência da microbiolização de sementes com isolados de *Trichoderma* sp. Para a análise de sanidade, sementes foram dispostas em placa de Petri sobre três folhas de papel de filtro umedecidos com soluções de KCl, NaCl e manitol nos potenciais hídricos de -0,6; -0,8; -1,0 e -1,2 MPa além de dois tratamentos adicionais: método de incubação em papel de filtro e o método do congelamento. Para a microbiolização, sementes de níger foram imersas em uma suspensão de 10^6 conídios/ml de *Trichoderma* sp., seguida de análises de sanidade e da qualidade fisiológica das sementes. O método de incubação em papel de filtro modificado com restrição hídrica reduziu a germinação de sementes de níger e não alterando de forma significativa a incidência de fungos no teste de sanidade. O KCl no potencial de -1,2 MPa foi o soluto que apresentou as maiores porcentagens de redução na germinação e menor comprimento de raiz primária. A microbiolização reduziu a incidência dos fungos associados as sementes e produziu plantas de maior altura e matéria seca.

Palavras-chave: Condicionamento osmótico, blotter test, bioprotetores, tratamento de sementes, *Alternaria* sp.

**RESTRICTION ON WATER TEST WITH HEALTH AND
MICROBIOLIZATION *Trichoderma* sp. IN NIGER SEEDS (*Guizotia
abyssinica*)**

ABSTRACT – Niger (*Guizotia abyssinica*) is an oilseed plant, originally from Ethiopia, and its expansion in Brazil demand good quality seeds physical, physiological and sanitary. In seed health testing is common to use water restriction to inhibit germination and contamination between seeds with the external environment, it is imperative that these treatments do not interfere with the growth of target organisms evaluation. The use of the technique of seeds microbiolization with some *Trichoderma* species has been successful in controlling fungi and their effectiveness is unknown in Niger. Aiming to contribute information to meet these demands, there were two laboratory experiments. The first was to evaluate the efficiency of water restriction on the inhibition of germination of seeds for adaptation of the method of incubation on filter paper in sanity. The second assessed the efficiency of seed microbiolization with *Trichoderma* sp. For the analysis of sanity, seeds were placed in Petri dishes on three sheets of filter paper moistened with solutions of KCl, NaCl and mannitol at the potentials of -0.6, -0.8, -1.0 and -1.2 MPa and two additional treatments: incubation method on filter paper and the method of freezing. To Microbiolization, niger seeds were immersed in a suspension of 10^6 conidia / ml of *Trichoderma* sp., Followed by health analysis and physiological seed quality. The method of incubation on filter paper modified with water restriction reduced the germination of seeds of the niger and not changing significantly the incidence of fungi in sanity. The KCl in the potential of -1.2 MPa was the solute had the highest percentages of reduction in germination and shorter length of primary root. The microbiolization reduced the incidence of fungi associated with seeds and plants produced greater height and dry matter.

Keywords: Osmotic conditioning blotter test, bioprotectors, seed treatment, *Alternaria* sp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Níger	13
2.2 Sanidade de sementes	15
2.3 Métodos para teste de sanidade de sementes	16
2.4 Microbiolização	19
2.5 <i>Trichoderma</i> sp. no microbiolização de sementes	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Experimento 1- Restrição hídrica em teste de sanidade de sementes	23
3.2 Experimento 2 - Microbiolização de sementes.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Experimento 1- Restrição hídrica em teste de sanidade de sementes	27
4.2 Experimento 2 - Microbiolização de sementes	35
5 CONCLUSÕES.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

Para que o estabelecimento inicial de uma lavoura não seja prejudicado a sanidade das sementes e suas qualidades fisiológicas devem ser analisadas antes do seu plantio. A sanidade de semente refere-se, primariamente, à presença ou ausência de microrganismos patogênicos interna e externamente, tais como fungos, bactérias, vírus e nematóides. A utilização de lotes de sementes de alta qualidade é um fator importante para o sucesso de qualquer lavoura, pois reduz a entrada de agentes fitopatogênicos, que podem ser levados ao campo e provocarem redução na germinação e vigor, além de ser focos primários de doenças.

Na análise e identificação de fungos em sementes existem alguns métodos que são mais utilizados, como o método de incubação no papel de filtro ou “blotter test” e métodos que utilizam meios de cultura. Durante o período da realização dos testes de sanidade pelo método de incubação no papel de filtro, pode ocorrer a germinação das sementes tornando o procedimento mais demorado além de prejudicar a avaliação da incidência de fungos, afetando os resultados finais, pois há risco de contaminação entre as sementes e o exterior do recipiente (MACHADO, 2003).

Com a finalidade de reduzir ou inibir a germinação de sementes, diferentes restritores hídricos vêm sendo empregados e avaliados em teste de sanidade. No entanto, esses restritores podem ocasionar danos ao processo germinativo quando os solutos penetram nas células em níveis tóxicos, (BRACCINI et al., 1996) ou também pela inibição da atividade e/ou síntese de enzimas hidrolíticas indispensáveis à germinação das sementes, induzida por concentração elevada de sais (CAMPOS e ASSUNÇÃO, 1990).

Dentre as principais medidas utilizadas pelos agricultores com relação ao controle de doenças em plantas está o tratamento de sementes, com uso de fungicidas sintéticos e o plantio de cultivares resistentes. A resistência genética é uma medida altamente desejável devido ao baixo custo e à alta eficiência. No entanto, ainda não se tem conhecimento de cultivares de níger (*Guizotia abyssinica*) resistentes a doenças e não existem fungicidas

registrados, no Brasil, para esta cultura. Além disso, o uso destes produtos acarreta maior custo de produção e danos ao meio ambiente e a saúde do trabalhador rural.

Como alternativa ao uso de fungicidas sintéticos a técnica de microbiolização de sementes é um processo que envolve o uso de microrganismos, que agem como um meio de defesa das plantas contra agentes fitopatogênicos. É um método prático e relativamente simples para o controle de patógenos transmitidos por essa via.

Entre os fungos com potencial de biocontrole, o *Trichoderma* spp. tem sido bastante estudado, dado suas particularidades de antagonismo. Esse fungo é considerado saprófita potente e eficiente por atuar como antagonista de alguns fitopatógenos de importância econômica, e também por estimular o crescimento de plantas (RESENDE et al., 2004).

Objetivou-se nesse trabalho avaliar a eficiência de restritores hídricos para aperfeiçoamento do método de papel de filtro em testes de sanidade em sementes de níger e a eficiência da microbiolização com isolados de *Trichoderma* spp. no tratamento de sementes e seus efeitos sobre a qualidade sanitária e fisiológica das sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Níger

Níger (*Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass. Família *Asteraceae*), é uma planta anual, possui crescimento indeterminado, dicotiledônea, com reprodução sexuada, oleaginosa, com germinação epígea (GETINET e SHARMA, 1996).

Suas folhas possuem de 10 a 20 cm de comprimento e de 3 a 5 cm de largura. A haste é lisa ou ligeiramente rugosa com cerca de 1,5 cm de diâmetro na base e a planta é, geralmente, bem ramificada. Suas hastes são ocas e quebram com facilidade. As plantas chegam a atingir, em média, 1,4 m de altura, mas podem variar consideravelmente como resultado de influências ambientais. Sua inflorescência é axilar, formando capítulos. A flor é amarela e, raramente, um pouco verde. O capítulo mede de 1,5-5 cm de diâmetro com 0,5-2 cm de comprimento, podendo ser constituída de seis a oito pétalas (GETINET e SHARMA, 1996).

As plantas inteiras são utilizadas como adubo verde na fase de pré-floração e sua semente para extração de óleo, na fabricação de saponáceos, tintas, lubrificantes e combustíveis de iluminação. O resíduo conhecido como a torta da semente apresenta potencial para alimentação animal, pois contém cerca de 33% de proteínas. Na América do Norte as sementes são utilizadas como alimento para pássaros (KANDEL e PORTER, 2004). As sementes contêm até 40% de óleo comestível, 20,9% de carboidratos e 27,8% de proteínas (GETINET e SHARMA, 1996).

Guizotia abyssinica é a única espécie cultivada do gênero, particularmente na Etiópia, seu centro de origem e diversidade, cultivada, principalmente, por seu óleo comestível (GELETA et al., 2007). Além da Etiópia, que apresenta uma produtividade média de 700 kg/ha (GETINET e SHARMA, 1996) é explorada agronomicamente na Índia, constituindo cerca de 50% e 3% da produção total de oleaginosas destes países, respectivamente; é também cultivada em outros países africanos e asiáticos (MURTHY et al., 1993).

Na Etiópia é cultivado em solos alagados, onde a maioria das oleaginosas não conseguiria crescer, e contribui muito para a conservação e recuperação de solos (GETINET e SHARMA, 1996). A espécie já é cultivada nos EUA (KANDEL et al., 2004) e no Brasil. No estado de Mato Grosso, na região de Primavera do Leste, a espécie é cultivada há mais de 10 anos, sendo que na safra 2010 / 2011 foram plantados, aproximadamente, 1000 ha da cultura. A semeadura é realizada em janeiro, utilizando 17 kg de sementes/ha, com ciclo de 75 a 90 dias.

É uma planta que está sendo introduzida no Brasil e existem poucas informações a respeito de doenças que atacam esta cultura no país. Segundo Rajpurohit (2011) as doenças mais importantes encontradas no níger são: podridão do colmo (*Sclerotium rolfsii*); podridão da macrofomina (*Macrophomina phaseolina*); damping off (*Rhizoctnia solani*), cercosporiose (*Cercospora guizoticola*), mancha de alternária (*Alternaria* sp.), oídio (*Sphaerotheca* sp.); ferrugem (*Puccinia guizotiae*) e mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv *guizotiae*). No Brasil já foram observados os seguintes fungos associados às sementes: *Cercospora* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. (Santaella et al., 2011).

A mancha de alternária está entre as principais doenças do níger relatadas na Índia e na Etiópia (RAJPUROHIT, 2011). O fungo *Alternaria* infecta semente, sendo transmitido por este meio, causando perdas na germinação, ou serem transmitidos às plântulas causando manchas foliares (ROTEM, 1994).

O girassol, também da família Asteraceae, apresentam a mancha de alternária, causada por *Alternaria helianthi*, como uma das principais doenças de ocorrência no Brasil, ocorrendo praticamente em todas as regiões e épocas de semeadura (LEITE et al., 2005).

Outro fator relevante que diz respeito a introdução do níger no Brasil está relacionado com a introdução de biocombustíveis na matriz energética brasileira, que propõe diminuir a emissão de poluentes oriundos de combustíveis fósseis. Com isso, o aumento ao incentivo às pesquisas com plantas potencialmente produtoras de óleo tem crescido muito nos últimos

anos. Dentre as espécies vegetais com potencial comercial para a obtenção de biodiesel destaca-se o níger, que pode também ser utilizado como cobertura do solo no outono/inverno (CARNEIRO et al., 2008; SARIN et al., 2009)

2.2 Sanidade de sementes

As doenças de plantas representam um dos fatores de grande risco para a agricultura, prejudicando a produção final, com prejuízos para produtores e consumidores. A intensidade da doença e suas perdas são condicionadas por vários fatores, entre eles: hospedeiro, patógeno, condições do ambiente e manejo empregado.

A Fitopatologia entra como uma área da Agronomia onde é possível auxiliar o desenvolvimento da produção agrícola, buscando resolver problemas relacionados ao manejo de doenças. Dentre os fatores que afetam a qualidade das sementes, a sanidade merece atenção especial, pois está relacionado com a continuação do ciclo biológico de alguns microrganismos. As sementes, de modo geral, podem abrigar e transportar microrganismos ou agentes patogênicos de todos os grupos taxonômicos, causadores ou não de doenças (MENTEN, 1996), e a utilização de sementes infectadas com patógenos é considerada uma das formas mais eficientes de distribuição aleatória do inóculo inicial de um patógeno na lavoura (DHINGRA, 2010).

Considerando que a semente é um insumo básico para a reprodução de grande parte das espécies vegetais, sua sanidade merece atenção especial, principalmente por parte dos sistemas de certificação. Por isso, é importante a realização do teste de sanidade, pois através dele conhece-se a presença e o grau de ocorrência de microrganismos associados as sementes, que causam doenças e que, transmitidos por essa via, são capazes de reduzir a produtividade (POPINIGIS, 1977). Além disso, são fornecidas informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, tratamento de sementes, entre outros (MACHADO, 2000).

2.3 Métodos para teste de sanidade em sementes

A identificação de organismos patogênicos nas sementes torna-se uma ferramenta importante no manejo fitossanitário de doenças e a escolha do método utilizado na análise de sanidade depende do tipo de patógeno, das condições disponíveis e do propósito do teste.

Entre os organismos presentes nas sementes, e que podem ser transmitidos para plântulas, o grupo dos fungos é o mais numeroso, seguido das bactérias, vírus e alguns nematóides (MACHADO, 1988). Dentre os métodos usualmente utilizados para a verificação de vírus em sementes estão os biológicos, que consistem na observação dos sintomas nas plantas provenientes da germinação das sementes, os testes sorológicos como ELISA (Enzymelinked immunosorbent Assay) e as técnicas moleculares como o PCR (Polymerase Chain Reaction) para vírus de DNA e o RT-PCR (reverse transcriptase PCR) para vírus de RNA (BARROCAS e MACHADO, 2010).

Em relação aos fungos, as técnicas utilizadas para a detecção destes microrganismos em sementes baseiam-se em diferentes aspectos, como análise visual da amostra e da fração impura, exame microscópico da suspensão proveniente da lavagem de sementes, exame de embriões, método do rolo de papel, incubação em meios de cultura padronizados ou meios semi-seletivos e método de incubação em papel de filtro (blotter test) (BARROCAS e MACHADO, 2010).

Entre esses, os mais utilizados são os métodos que usam meio de cultura, como o plaqueamento em meio ágar e método de incubação em papel de filtro. Os que utilizam meio de cultura podem ser muito variados, mas precisam de uma fonte de carbono, como a glicose, nitrogênio, além de outros elementos em menor quantidade, tais como potássio, fósforo, enxofre, ferro, magnésio, zinco, manganês e vitaminas (ZAUZA et al., 2007). O método de incubação em papel de filtro é aplicado a quase todos os tipos de sementes, incluindo sementes de cereais, hortaliças, plantas ornamentais e essências florestais (NEERGAARD, 1979), principalmente por ser um método rápido, relativamente simples e de baixo custo.

Bons resultados no método de incubação em papel de filtro estão relacionados à inibição da germinação das sementes, especialmente quando se avalia sementes de espécies que apresentam rápida germinação. Dentre os métodos que inibem a germinação das sementes estão o método do congelamento ou com inserção do herbicida 2,4-D na solução de umedecimento do substrato de papel. O uso do 2,4-D foi descontinuado por ser um produto tóxico para laboratoristas, e prejudicial aos fungos quando utilizado em altas concentrações (LIMONARD, 1968).

Embora o método de incubação em papel de filtro (blotter test) com congelamento seja utilizado em todo o mundo com a finalidade de impedir a germinação das sementes de diversas espécies, principalmente das gramíneas, durante o período de incubação, ele apresenta algumas restrições. Trata-se de um teste que, por causar a morte das sementes, superestima a ocorrência de alguns fungos, incluindo os saprófitas, presentes nas sementes devido à eliminação do componente resistência do hospedeiro, além de constituir-se em obstáculo ao fluxo operacional de um maior número de amostras para análise em curtos períodos de tempo. (CELANO et al., 2012).

Para impedir a germinação de sementes tem sido utilizado o método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica para limitar a germinação da semente (COUTINHO et al., 2001; FARIAS et al., 2003; MACHADO et al., 2003). Este método é conveniente para as infecções acompanhadas por hifas, frutificações ou por esporos, sendo eficiente para identificar a maioria dos fungos veiculados por sementes (GASPAROTTO et al., 2009). A técnica baseia-se no uso de restrição hídrica do substrato ou do meio de cultura, através da adição de restritores em solução, regulando-o a potenciais hídricos que não permitam umidade suficiente para que ocorra a emergência da radícula. A inibição da germinação por restrição hídrica propicia maior contato da semente com o substrato, uma vez que impede o desenvolvimento da plúmula, estimulando a esporulação do fungo e facilitando a detecção e a quantificação destes (BARBA et al., 2002).

O uso da restrição hídrica, no âmbito da tecnologia/fisiologia de sementes, já tem sido amplamente explorado com o intuito de otimizar o processo de germinação de algumas espécies de sementes, e isto constituiu a base para a aplicação deste princípio em diversas áreas na patologia de sementes, onde, além do teste de sanidade, esta técnica também pode ser utilizada para: obtenção de sementes infectadas; estudos sobre relações entre patógeno e sementes; reprodução/simulação de condições de estresse hídrico e recuperação ou separação de sementes saudáveis de sementes contaminadas pertencentes a um mesmo lote (MACHADO et al., 2012).

Diferentes solutos já foram usados para controle da germinação de sementes de várias espécies vegetais, tais como NaCl, KCl, KNO₃, manitol e polietileno glicol (BRACCINI et al., 1996; FARIAS et al., 2003; MACHADO et al., 2003; FALLEIRO et al., 2010).

Comparando a germinação de sementes de diversas espécies utilizando os solutos NaCl, KCl e Manitol em concentrações variando numa faixa de -0,4 Mpa a -1,2 Mpa, pode-se observar que o manitol foi o soluto que menos restringiu a germinação das sementes, independente da concentração da solução, e nos casos que os autores avaliaram o comprimento de radícula também foi o que permitiu maior comprimento da mesma (BRACCINI et al., 1996; COUTINHO et al., 2001; COSTA et al., 2003; FARIAS et al., 2003; MACHADO et al., 2004; GARCIA et al., 2008; CARVALHO et al., 2009)

O manitol além de propiciar uma maior porcentagem de germinação de sementes no teste de sanidade pelo método de papel de filtro, o que dificulta a avaliação dos fungos, também é o soluto que mais utiliza, em gramas, a quantidade de produto necessária para chegar a determinado potencial hídrico.

Muitas sementes de diferentes espécies vegetais já foram testadas com sucesso por esta técnica, sendo algumas delas: soja (BRACCINI et al., 1996; MACHADO et al., 2003), feijão e arroz (COUTINHO et al., 2001), girassol (FALLEIRO et al., 2010), trigo e milho (FARIAS et al., 2003) e algodão (MACHADO et al., 04). Analisando estes trabalhos percebe-se que

os solutos NaCl, KCl e PEG possuem comportamentos semelhantes em relação a estas espécies, proporcionando maior inibição da germinação das sementes em potenciais acima de -0,6 MPa, independente do soluto utilizado. Dentre estas espécies, a soja foi a que se mostrou mais sensível a salinidade, apresentando inibição da germinação a partir de -0,3 MPa em NaCl (BRACCINI et al., 1996). Em relação à incidência de fungos associados as sementes no teste de sanidade pode-se perceber que em todas as espécies avaliadas os solutos e as concentrações utilizadas não influenciaram na presença dos agentes patogênicos.

Em relação a germinação de sementes de níger, trabalhos tem demonstrado que sua germinação é facilmente afetada com o uso da restrição hídrica. A exposição ao NaCl, KCl e CaCl_2 reduziu o poder germinativo e o crescimento das plântulas, sendo mais sensíveis aos efeitos da salinidade causados por CaCl_2 e KCl do que pelo NaCl, evidenciado pela redução acentuada do porcentual de germinação e índice de velocidade de emergência de sementes a partir do potencial de -0,3 MPa, inibindo a germinação das sementes no potencial de -1,2 MPa (MARQUES et al., 2011a; GORDIN et al., 2012).

2.4 Microbiolização

Entre a grande maioria de agricultores, a prática recomendada para o controle de patógenos associados às sementes é a aplicação de fungicidas sintéticos por meio do tratamento de sementes antes do plantio (LUZ, 1998b).

O uso dos produtos químicos utilizados na agricultura podem trazer efeitos adversos. Além de destruírem o equilíbrio natural entre microrganismos, muitas vezes causam contaminações dos lençóis freáticos, intoxicação de trabalhadores rurais, além de propiciarem o surgimento de raças de patógenos resistentes. Os fungos podem desenvolver mecanismos que lhe confirmam resistência a produtos tóxicos, para que se mantenha a sobrevivência da espécie. A grande capacidade de multiplicação e a

diversidade dos fungos fornecem a oportunidade para a seleção de linhagens resistentes (PARREIRA, 2009).

Outro desequilíbrio que estes produtos químicos podem causar é a erradicação de microrganismos responsáveis pela degradação de matéria orgânica ou de organismos utilizados em programas de controle biológico, ocasionando problemas no meio ambiente (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003).

Uma alternativa para o uso de fungicidas sintéticos seria a microbiolização de sementes, que consiste na utilização de microrganismos, ou de seus metabólitos, na proteção de sementes. O potencial destes agentes microbianos de biocontrole vem sendo realizado por diversos autores (LUZ, 1991; REIS et al., 1995; FARIA et al., 2003; RESENDE et al., 2004; MERTZ et al., 2009).

A microbiolização de sementes é uma técnica que foi iniciada em 1937, e desde então é uma prática de biocontrole muito atrativa e promissora para pesquisadores e agricultores, tendo sido obtidos avanços tecnológicos para várias culturas (LUZ, 1993). A inclusão de agentes de controle no tratamento de sementes é um fator relevante, pois além de ser uma alternativa aos produtos químicos, tem como princípio básico a ação que estes microrganismos exercem na eliminação ou redução do desenvolvimento de patógenos transmitidos por essas vias (MENTEN, 1996). Neste contexto, o controle biológico tem demonstrado resultados eficientes na redução de patógenos transmitidos por sementes (MISSIO et al., 2003).

Entre as espécies para as quais já se obtiveram sucesso com o uso desta técnica estão: pimenta (DINIZ et al., 2009), arroz (LUDWIG et al., 2009), soja (MERTZ et al., 2009), algodão (FARIA et al., 2003), milho (LUZ et al., 1998b) e feijão (MENEZES, 1992).

Estudos têm apontado que os principais agentes usados na microbiolização das sementes são os fungos antagonistas que incluem principalmente os filamentosos, tais como: *Chaetomium*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Gliocladium*. Entre as espécies de bactérias, os gêneros

Bacillus, *Streptomyces* e *Pseudomonas* têm se mostrado promissores no controle de alguns fungos patogênicos, entre os quais algumas espécies de *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Helminthosporium* e *Macrophomina*, que podem ser veiculados por sementes de diversas espécies de plantas (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

2.5 *Trichoderma* sp. na microbiolização de sementes

Entre os biocontroladores usados contra patógenos do solo têm-se destacado isolados selvagens e melhorados de *Trichoderma* spp. (REIS et al., 1995), que pertencem à classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae. São produzidos através da multiplicação dos fungos do gênero e caracterizam-se pela ampla produção de conídios a partir de conidióforos que se originam diretamente das hifas. Esses fungos são considerados saprófitas potentes e eficientes por atuarem como antagonistas de alguns fitopatógenos de importância econômica (RESENDE et al., 2004).

São vários os mecanismos de ação utilizados pelo *Trichoderma*, dentre os quais destacam-se a produção de metabólitos e enzimas com propriedades antifúngicas, o hiperparasitismo e a competição por nutrientes (HARMAN et al., 2004).

Segundo Chet (1987), os isolados que são micoparasitas e utilizados no controle biológico de fitopatógenos têm sido geralmente classificados como pertencentes à espécie *T. harzianum*. Entretanto, Hermosa et al. (2000) estudando diferentes isolados de *Trichoderma* e constatou quatro isolados com potencial de biocontrole: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*

A ação de *Trichoderma* spp. é conhecida na literatura no controle de *Meloidogine javanica* (SHARON et al., 2001), *Pythium* (NASEBY et al., 2000) *Rhizoctonia* spp. (CÚNDOM et al., 2003), *Phytophthora* spp. (ETEBARIAN et al., 2000), *Botrytis* spp. (LISBOA et al., 2007) e *Crinipellis pernicioso* (SANOGO et al., 2002)

Até o momento não foi registrado qualquer tipo de risco que *Trichoderma* spp. possa trazer para saúde humana e/ou animal. Além do efeito no controle de patógenos de plantas, algumas linhagens do fungo ainda podem ter ação benéfica no crescimento e florescimento de plantas hortícolas (BAKER, 1991).

Trichoderma spp. vem sendo considerado por diversos autores como promotor de crescimento e sua potencialidade tem sido verificada na germinação de sementes e no crescimento de plantas (HARMAN, 2000; RESENDE et al., 2004; CARVALHO FILHO, 2008). Algumas das espécies que já receberam a microbiolização com *Trichoderma* spp. e obtiveram sucesso com o uso desta técnica estão: milho, algodão, pimentão e melão. A aplicação do fungo via tratamento de sementes tem apresentado resultados satisfatórios, proporcionando melhoria no crescimento e maior teor de matéria seca das plantas destas espécies (LUZ, 2001; FARIA et al., 2003; RESENDE et al., 2004; BEGUM et al., 2010). Os mecanismos envolvidos no aumento do crescimento e do rendimento, induzidos por espécies de *Trichoderma*, aparentemente são o controle de patógenos secundários, que diminuem o crescimento e a atividade das raízes, além da produção de fatores estimulantes de crescimento (Baker, 1991).

Atualmente, *Trichoderma* spp. pode ser encontrado em formulações prontas para serem utilizadas na agricultura nas mais diversas formas: pós-molháveis, grânulos dispersíveis, suspensões concentradas, óleos emulsionáveis, grãos colonizados e esporos secos (MORANDI et al., 2009), sendo comercializado por diferentes empresas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Experimento 1 – Eficiência da restrição hídrica no teste de sanidade de sementes

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso (FAMEVZ/UFMT), Campus Cuiabá.

As sementes de níger foram provenientes de uma lavoura do município de Primavera do Leste – MT, referentes à safra 2010/2011, colhidas mecanicamente e armazenadas no barracão da fazenda, de onde foram coletadas as amostras, acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara climatizada ($17,0 \pm 1,5$ °C e $73 \pm 4\%$ de umidade relativa do ar).

Para avaliar os efeitos da restrição hídrica na germinação de sementes de níger foi realizado o teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro (Blotter test) modificado com os restritores. As sementes foram distribuídas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (50 sementes/placa de Petri), contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com solução osmótica (2,5 vezes o peso do papel de filtro seco). As soluções osmóticas foram preparadas com manitol, cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl), nos potenciais hídricos de 0, -0,6, -0,8, -1,0 e -1,2 MPa. Como testemunhas foram utilizados dois tratamentos adicionais: método de incubação em papel de filtro convencional e o método do congelamento.

Para calcular a quantidade de cada soluto utilizada na preparação da solução foi utilizado o programa computacional SPMM (MICHEL e RADCLIFFE, 1995) e estão indicadas na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de produto utilizado para o preparo das soluções de manitol, KCl e NaCl, nos diferentes níveis de potencial osmótico testados.

Potencial osmótico (MPa*)	Manitol (g/300 mL de água)	KCl (g/300 mL de água)	NaCl (g/300 mL de água)
-0,6	12,87	2,94	2,301
-0,8	16,98	3,93	3,06
-1,0	21,03	4,92	3,81
-1,2	25,02	5,91	4,59

O preparo de cada solução foi realizado em frascos contendo 300 mL de água destilada, onde foi adicionado, nos frascos, a quantidade de soluto de acordo com o potencial osmótico desejado, foi feita a diluição do soluto na água com auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, as soluções foram esterilizadas a 120°C por 30 minutos.

O método de incubação em papel de filtro convencional e o método do congelamento tiveram o substrato umedecido com água destilada esterilizada.

As placas foram distribuídas, aleatoriamente, na câmara de incubação com temperatura de 22°C (\pm 2°C) e mantidas por sete dias sob regime alternado de 12 horas de luz. Na incubação em substrato de papel com congelamento foi seguido a metodologia descrita, porém no segundo dia de incubação, as placas foram levadas ao congelador, por 24 horas, a -20°C, e retornaram posteriormente à câmara de incubação (Neergaard, 1979).

Após o período de incubação foram feitas as seguintes avaliações:

- Incidência de fungos: identificação e quantificação dos fungos nas sementes foram realizadas por meio do preparo de lâminas e comparação das estruturas morfológicas do fungo com aquelas citadas na literatura (BARNETT e HUNTER, 1970; NELSON, 1983; ROTEM, 1994) com auxílio dos microscópios estereoscópio e ótico. Os fungos foram quantificados analisando cada semente na placa e anotando os fungos encontrados em cada uma delas.

- Comprimento de raiz primária das plântulas (cm): após a realização do teste de sanidade foi avaliado o comprimento de raiz primária das plântulas germinadas. Cada raiz foi medida, separadamente, e, em seguida, calculado o comprimento médio das raízes por tratamento.

O ensaio constituiu-se de 14 tratamentos em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 50 sementes, em esquema fatorial 3x4+2 (três solutos, quatro potenciais e dois tratamentos adicionais: os métodos de incubação em papel de filtro e o congelamento). Os dados foram submetidos à análise de variância, onde, com o grupo fatorial aplicou-se o teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Para a comparação das médias do grupo fatorial com a testemunha aplicou-se o teste de Dunnett ao nível de significância de 5%. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico Assistat (SILVA, 2009).

3.2 - Experimento 2 – Microbiolização de sementes

Três isolados de *Trichoderma* sp., provenientes de sementes de soja (*Glycine max*), trigo (*Triticum aestivum*) e quinoa (*Chenopodium quinoa*) foram armazenados em câmara refrigerada no laboratório, e utilizados para microbiolização das sementes. O fungo foi isolado das sementes e previamente cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar por sete dias, a 22°C ±2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Para a inoculação das sementes com o agente de biocontrole foi preparada uma suspensão com água destilada esterilizada e Tween 20 como espalhante adesivo, na proporção de 100 ml de água para 1ml de Tween, que foi aplicada sobre o meio de cultura, onde os conídios de *Trichoderma* sp. foram removidos da superfície com o auxílio de um pincel. A concentração da suspensão foi determinada em câmara de Neubauer, em aproximadamente 10⁶ conídios/ mL. As sementes foram imersas nessa suspensão por três minutos e, posteriormente, secas a 26 °C ± 2 °C por 24 horas. As sementes não tratadas (testemunha) foram embebidas em água destilada esterilizada e seguiram a mesma metodologia. Imediatamente após os tratamentos as sementes foram submetidas aos seguintes testes:

- Incubação em papel de filtro com restrição hídrica: as sementes foram distribuídas em placas de Petri, tendo como substrato três folhas de papel de filtro umedecidas com solução de KCl na concentração de -1,2 MPa, e acondicionadas à temperatura de 22 ± 2 °C, em fotoperíodo de doze horas. A avaliação da presença de fungos fitopatogênicos nas sementes foi determinada após sete dias de incubação. Os dados foram expressos em porcentagem de fungos nas sementes e separados por espécie.

- Germinação em rolo de papel: As sementes foram dispersas em substrato de papel toalha umedecido com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco (BRASIL, 2009). Os rolos foram mantidos em germinador à temperatura constante de 25 °C. Após sete dias foi avaliada porcentagem de plântulas normais.

- Emergência em areia: as sementes foram distribuídas em caixas de isopor, tendo como substrato areia esterilizada, umedecida com água com 60% de sua capacidade de retenção e umedecidas novamente quando necessário, mantidas à temperatura $30 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. No décimo dia foi avaliado o número de plântulas normais.

- Índice de velocidade de emergência (IVE): calculado a partir do teste de emergência em areia, avaliando a cada 24 horas, até o 10º dia, de acordo com o número de plântulas que apresentaram os cotilédones acima da superfície do solo. Ao final do teste foi calculado o IVE empregando-se a fórmula proposta por Maguire (1962), onde:

$$\text{IVE} = E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn$$

sendo: E1, E2, En = número de plântulas emergidas na primeira, segunda, até a última contagem e N1, N2, Nn = número de dias desde a primeira, segunda, até a última contagem.

- Comprimento da parte aérea das plantas – ao final do teste de emergência em areia foi avaliado o comprimento da parte aérea de plantas normais, em centímetros, aos 30 dias após a semeadura.

- Massa seca de planta: foram avaliadas as plantas normais, obtidas a partir do teste de emergência em areia, aos 30 dias. As repetições de cada lote foram acondicionadas em sacos de papel, identificados, e levados à estufa

com circulação de ar forçada, mantida à temperatura de 80°C por um período de 24 horas (NAKAGAWA, 1994). Após este período, cada repetição teve a massa avaliada em balança com precisão de 0,001g, e os resultados médios expressos em miligramas por planta.

Foram realizados os seguintes tratamentos:

1. Sementes sem tratamento – testemunha absoluta
2. Sementes tratadas com fungicida (carbendazim + thiram 200g i.a. 100 kg⁻¹ de sementes) – testemunha química
3. Sementes microbiolizadas com Trichoderma, isolado 1 (soja)
4. Sementes microbiolizadas com Trichoderma, isolado 2 (trigo)
5. Sementes microbiolizadas com Trichoderma, isolado 3 (quinoa)

Para todas as avaliações, foram realizadas quatro repetições de cinquenta sementes, totalizando duzentas sementes por tratamento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância a 5% e auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Experimento 1 – Eficiência da restrição hídrica no teste de sanidade de sementes

Os resultados de germinação das sementes submetidas aos tratamentos no teste de sanidade com uso da técnica de incubação em de papel de filtro modificado com restritores hídricos encontram-se na Tabela 2, evidenciando os efeitos da restrição hídrica em comparação com os tratamentos adicionais.

TABELA 2. Porcentagem de germinação de sementes de *Guizotia abyssinica*, pelo método de incubação em papel de filtro modificado com restritores hídricos. UFMT, Cuiabá - MT. 2012.

Tratamentos	-0,6 MPa	-0,8 MPa	-1,0 MPa	-1,2 MPa
NaCl	57,0* Aa	34,5* Bb	33,5* Ba	26,0* Ba
KCl	46,0* Ab	16,5* Bc	12,0* BCc	7,0* Cb
Manitol	43,5* Ab	46,5* Aa	24,0* Bb	8,0* Cb
Método Congelamento		32,5*	(testemunha)	
Incubação em papel de filtro		69	(testemunha)	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). *Médias diferem estatisticamente da testemunha (Dunnett; $p \leq 0,05$). CV = 18,6%

Na germinação das sementes, comparando os solutos, observou-se que as soluções de KCl e Manitol, nas concentrações de -1,2 MPa, foram as que apresentaram as maiores porcentagens de redução na germinação, onde apenas 7 e 8% das sementes germinaram, respectivamente. Nas concentrações de -1,0 e -0,8 MPa a solução com KCl apresentou os menores índices de porcentagem de germinação das sementes quando comparado com o NaCl e manitol nas mesmas concentrações. Costa (2003), também obteve menor porcentagem de germinação quando utilizou o KCl como restritor hídrico no método de incubação em papel de filtro em sementes de feijão.

Redução acima de 50% na germinabilidade das sementes em relação à testemunha, ocorreram a partir do potencial hídrico de -0,8 MPa, com o KCl, porém com valores mais expressivos nas concentrações de -1,0 e -1,2 MPa, com maior efetividade quando se utilizou KCl e manitol como restritores.

A maioria das espécies cultivadas sofrem reduções acima de 50% quando em potenciais hídricos menores ou iguais a -1,0 MPa (FARIAS et al., 2003; MACHADO et al., 2007; BELLO et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; FALLEIRO et al., 2010).

Independente do soluto e da concentração utilizada, todos os tratamentos reduziram a porcentagem de germinação das sementes, demonstrando que as sementes de niger são facilmente afetadas pelos

solutos. Esses resultados corroboram com outros autores, que observaram redução significativa na germinação de sementes *G. abyssinica*, mostrando que essa espécie é sensível a baixos potenciais osmóticos (GORDIN et al., 2012; MARQUES et al., 2011a, 2011b).

É possível perceber também que conforme se diminuía potencial osmótico da solução, de - 0,6 a -1,2 MPa, menor é a porcentagem de germinação das sementes. Farias et al. (2003), avaliando o efeito da restrição hídrica com diferentes solutos na germinação de sementes de trigo e milho, constataram que o percentual de germinação das sementes também foi reduzido com o aumento do nível de restrição hídrica aplicada ao substrato.

Quanto à diferença da eficiência entre os solutos na inibição da germinação, Carvalho et al. (2009) atribuíram este fato a diferenças de toxidez provocadas pelos solutos, bem como diferenças de potencial hídrico de equilíbrio, que podem variar de acordo com as características das sementes de cada espécie, ou mesmo cultivares e lotes dentro de mesma cultivar.

Em relação ao método do congelamento, que interferiu de forma significativa na germinação das sementes e apresentou resultados próximos das soluções com NaCl, KCl e manitol, seu uso apresenta algumas desvantagens, como matar a semente e ser mais trabalhoso. Além disso, o método do congelamento favorece o crescimento de algumas bactérias e fungos saprófitas (LIMONARD, 1968).

Para o comprimento médio de raiz primária de plântulas (Tabela 3) percebeu-se que conforme se aumentava a concentração dos solutos menor era o comprimento de raiz primária das plântulas, sendo os melhores resultados nos potenciais osmóticos -1,0 MPa e -1,2 MPa, contribuindo para melhor qualidade na análise sanitária em sementes.

TABELA 3. Comprimento médio (cm) de raiz primária em plântulas de *Guizotia abyssinica* utilizando o método de incubação em papel de filtro modificado com restritores hídricos. UFMT, Cuiabá - MT. 2012.

	-0,6 MPa	-0,8 MPa	-1,0 MPa	-1,2 MPa
NaCl	0,81* Aa	0,25* Ba	0,17* Ba	0,11* Ba
KCl	0,36* Ab	0,07* ABa	0,04* Ba	0,02* Ba
Manitol	0,38* Ab	0,34* Aa	0,14* ABa	0,04* Ba
Método Congelamento		1,38*	(testemunha)	
Incubação em papel de filtro		4,02	(testemunha)	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). *Médias diferem estatisticamente da testemunha (Dunnnett; $p \leq 0,05$). CV = 26,7%

Resultados semelhantes foram encontrados por Machado et al. (2007) trabalhando com sementes de algodoeiro e utilizando os solutos manitol e NaCl, quando obteve menor comprimento da raiz primária das plântulas nas concentrações de -1,0 MPa e -1,2 MPa, com redução de até 65%. Coutinho (2001), em sementes de arroz e feijão, utilizando os restritores hídricos NaCl, KCl e manitol, igualmente constatou maior inibição do comprimento da raiz primária das plântulas com a elevação da restrição hídrica do substrato, atingindo de 90 a 100% de redução no comprimento de raiz primária dessas espécies.

Independente do soluto utilizado, a partir de -0,6 MPa foi observado melhora na realização da análise de sanidade pois não houve desenvolvimento de raiz primária das sementes que germinaram (Figura 1), o que facilitou a identificação dos fungos presentes nas sementes durante a realização do teste, sem ocorrer contaminação entre as sementes ou com o meio exterior, o que aconteceria quando ocorre o desenvolvimento das plantas.

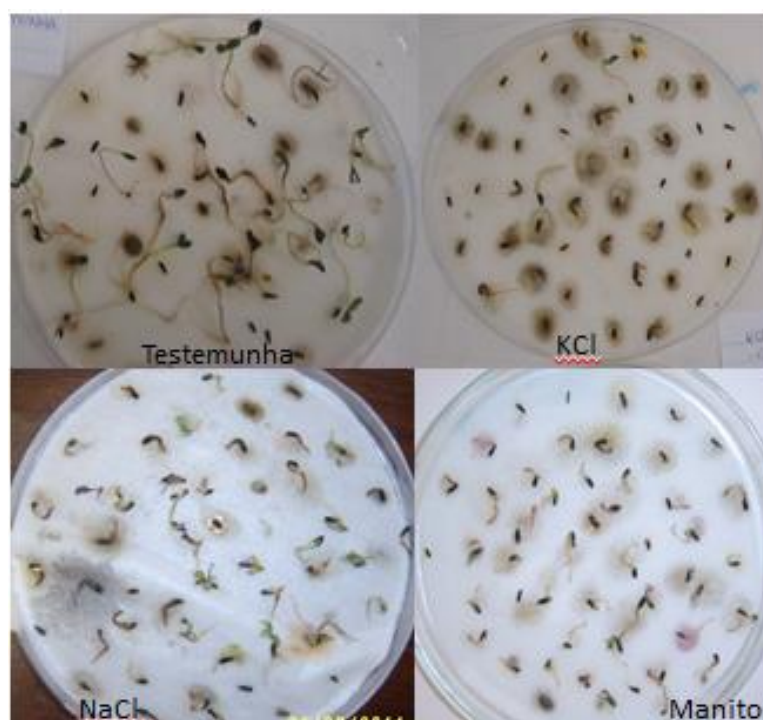


Figura 1. Resultado do teste de sanidade de sementes pelo método de incubação em papel de filtro modificado com uso de restritores hídricos na concentração de $-0,6$ MPa.

Marques (2011) ao avaliar a germinação de sementes de níger em diferentes disponibilidades hídricas do substrato também constatou que, embora tenha havido protrusão da raiz primária das sementes submetidas aos potenciais de $-0,4$ e $-0,8$ MPa, não houve crescimento de plântulas.

Araújo (2012) verificou resultados semelhantes em sementes de algodão, onde os solutos NaCl, KCl e manitol em potenciais de $-0,6$ e $-0,8$ MPa também proporcionaram redução no comprimento da raiz primária das plântulas.

Os fungos encontrados associados às sementes de níger pelo método de incubação em papel de filtro convencional foram: *Alternaria* sp., *Cercospora* sp., *Cladosporium* sp., *Sphacelia* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp, variando a sua incidência de 2% para *Bipolaris* sp. até 44% para *Alternaria* sp.

Os resultados dos principais fungos patogênicos associados as sementes quando utilizado o método do papel de filtro modificado com

restrição hídrica estão nas Tabelas 4, 5 e 6. A *Alternaria* sp. foi o fungo de maior incidência nas sementes, e seus resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Incidência média (%) de *Alternaria* sp. associados às sementes de *Guizotia abyssinica* pelo método de incubação em papel de filtro modificado com restritores hídricos. UFMT, Cuiabá, MT. 2012.

	-0,6 MPa	-0,8 MPa	-1,0 MPa	-1,2 MPa	Solutos
NaCl	48,0	37,0	42,5	36,5	41,0 A
KCl	37,5	41,5	33,5*	27,0*	34,8 B
Manitol	26,0*	24,0*	22,5*	18,5*	22,7 C
Concentrações	37,1 a	34,1 ab	32,8 b	27,3 c	
Método Congelamento		52,0	(testemunha)		
Incubação em papel de filtro		44,0	(testemunha)		

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula para solutos e minúscula para concentrações, não diferem estatisticamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). *Médias diferem estatisticamente da testemunha (Dunnett; $p \leq 0,05$). CV = 14,0%

Constatou-se que não houve interação entre os solutos e as concentrações. Quando são analisados somente os solutos, independentes da concentração, observou-se que a presença de *Alternaria* sp. foi inibida pelo uso do manitol, pois apresentou-se com apenas 22,7% das sementes com a presença do fungo, valor inferior quando comparado ao NaCl e KCl. Em todas as concentrações utilizadas na técnica da restrição hídrica, o uso do manitol também inibiu a presença do fungo quando comparado com os métodos de incubação em papel de filtro convencional e de congelamento. Carvalho et al. (2009) utilizando a técnica da restrição hídrica no teste de sanidade em sementes de cenoura constataram que o manitol interferiu no aparecimento de *Alternaria* sp. nas sementes quando comparado com o método convencional.

Da mesma forma, Celano et al. (2012) observaram que os valores médios de incidência de *Alternaria* sp. nas sementes pelo método do congelamento foram estatisticamente superiores do que aqueles registrados pelo método da restrição hídrica com uso do manitol.

Em relação à *Cercospora* sp. (Tabela 5), percebe-se que houve efeito dos solutos e das concentrações, quando estes são analisados

separadamente. Em relação aos solutos, NaCl e KCl inibiram a presença do fungo em aproximadamente 19% quando comparado com o manitol. Analisando as concentrações, os valores de -0,8, -1,0 e -1,2 MPa apresentaram uma redução na incidência dos fungos de 6,2%, 17,7% e 16,4%, respectivamente, quando comparados com a concentração de -0,6 MPa.

Tabela 5. Incidência média (%) de *Cercospora* sp. associados às sementes de *Guizotia abyssinica* pelo método de incubação em papel de filtro modificado com restritores hídricos. UFMT, Cuiabá, MT. 2012.

	-0,6 MPa	-0,8 MPa	-1,0 MPa	-1,2 MPa	Solutos
NaCl	19,5	24,5	16,0	20,0	20,0 B
KCl	24,0	18,5	21,5	19,5	20,8 B
Manitol	29,5	25,5	22,5	21,5	24,7 A
Concentrações	24,3 a	22,8 ab	20,0 b	20,3 ab	
Método congelamento		17,5	(testemunha)		
Incubação em papel de filtro		24,0	(testemunha)		

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula para solutos e minúscula para concentrações, não diferem estatisticamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Nenhuma média diferiu estatisticamente da testemunha (Dunnett; $p > 0,05$). CV = 24,17%

Por outro lado, quando se avalia a incidência do fungo com o uso de restritores hídricos nas diferentes concentrações, observou-se que nenhum dos solutos, mesmo em potencial de -1,2 MPa, apresentou interferência na incidência em relação ao método de incubação em papel de filtro convencional, o qual obteve 24% das sementes com presença de *Cercospora* sp.

Resultados semelhantes foram apresentados por Machado et al. (2003), trabalhando com os mesmos restritores, onde não foram observados diferenças acentuadas entre os restritores hídricos e potenciais utilizados, na incidência de *Cercospora* sp. em sementes de soja.

Para *Cladosporium* sp. (Tabela 6) também não ocorreu inibição da presença do fungo em relação ao tratamento padrão. Trabalhando com sementes de amendoim, Araújo et al. (2004) também não verificaram

restrição ao crescimento de *Cladosporium* sp. usando soluções de NaCl a 6%.

Tabela 6. Incidência média (%) de *Cladosporium* sp. associados às sementes de *Guizotia abyssinica* pelo método de incubação em papel de filtro modificado com restritores hídricos. UFMT, Cuiabá, MT. 2012.

	-0,6 MPa	-0,8 MPa	-1,0 MPa	-1,2 MPa
NaCl	48,0 Aab	49,0 Aa	45,5 Aa	44,5 Aa
KCl	49,5 Aa	46,0 Aa	45,0 Aa	35,5 Bb
Manitol	39,5 Bb	45,5 ABa	44,5 ABa	50,5 Aa
Método congelamento		39,0	(testemunha)	
Incubação em papel de filtro		43,0	(testemunha)	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (Tukey $p > 0,05$). Nenhuma média diferiu estatisticamente da testemunha (Dunnett, $p > 0,05$). CV = 13,5%

Em sementes de soja a utilização da restrição hídrica em teste de sanidade com os solutos NaCl, KCl e manitol, em potenciais de -0,6 a -1,0 MPa, igualmente não influenciaram no aparecimento de fungos do gênero *Cladosporium* (MACHADO et al., 2003).

Observando as Tabelas 4, 5 e 6 pode-se constatar, de forma geral, que os solutos utilizados para inibir a germinação das sementes não interferiram na identificação e incidência dos fungos fitopatogênicos. Esses resultados concordam com diversos autores (COUTINHO et al., 2001; FARIAS et al., 2003; MACHADO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004; MACHADO et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; FALLEIRO et al., 2010) onde a utilização da restrição hídrica, por meio dos solutos manitol, NaCl e KCl tem se apresentado como um procedimento promissor para impedir ou reduzir a germinação de sementes de diversas espécies por ocasião do método de incubação em papel de filtro, sem influenciar na incidência dos principais fungos associados às sementes.

O uso do congelamento como tratamento adicional não alterou de forma significativa a presença dos principais fungos observados no teste de sanidade. Barba et al. (2002) analisando diferentes métodos de detecção de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de cevada não averiguaram diferenças

na detecção do patógeno quando as sementes foram submetidas ao congelamento. Coutinho (2000), trabalhando com os mesmos restritores hídricos no teste de sanidade de sementes de arroz e de feijão, não constatou diferenças significativas entre os resultados quando comparado com método congelamento.

4.2 - Experimento 2 – Microbiolização de sementes

Foram detectados os seguintes fungos associados às sementes de níger no teste de sanidade: *Alternaria* sp., *Sphacelia* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Todos os isolados de *Trichoderma* sp., reduziram a incidência desses fungos nas sementes, de forma equivalente ao tratamento químico, sendo superior no caso de *Sphacelia* sp. (Tabela 7).

Tabela 7. Incidência média de fungos (%) em sementes de *Guizotia abyssinica*, em função de tratamento químico com fungicida e da microbiolização com isolados de *Trichoderma* sp. UFMT, Cuiabá, MT. 2012.

Tratamentos	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Sphacelia</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
Testemunha	3,4 b	4,1 b	2,4 b	6,6 b	5,1 b
Fungicida*	0,7 a	4,1 b	0,7 a	0,7 a	0,7 a
<i>Trichoderma</i> sp. (isol. soja)	0,7 a	0,7 a	0,7 a	1,1 a	0,9 a
<i>Trichoderma</i> sp. (isol. trigo)	0,7 a	0,7 a	0,7 a	1,27 a	0,7 a
<i>Trichoderma</i> sp. (isol. quinoa)	0,7 a	0,7 a	0,7 a	1,1 a	1,0 a
CV (%)	13,8	18,15	16,3	21,0	29,0

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). *Carbendazim + thiram 200 g i.a. 100 kg⁻¹ de sementes.

Os resultados em relação a microbiolização das sementes com *Trichoderma* sp. corroboram com outros autores, que utilizando *Trichoderma* sp. para controle de fungos patogênicos em sementes de diversas culturas agrícolas, também obtiveram sucesso, como em: milho (LUZ, 2001), pepino

(LUCON et al., 2009), trigo (LUZ, 1998), pimenta (DINIZ et al., 2009) e feijão (CARVALHO et al., 2009).

Os fungos com maior incidência média foram *Aspergillus* e *Penicillium*, presentes em 6,6 e 5,1% das sementes, respectivamente. Isto pode estar relacionado ao fato das sementes já estarem armazenadas na fazenda por aproximadamente um mês quando foram coletadas. Esses fungos são considerados fungos de armazenamento e podem causar redução na germinação e no crescimento das plântulas (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; NETTO e FAIAD, 1995). Autores citam estes gêneros como os principais fungos associados a sementes durante o armazenamento (NEERGAARD, 1979; NETTO et al., 1998).

A *Alternaria* sp. esteve presente em 3,4% das sementes e, segundo Rajpurohit (2011), é o agente causal da doença mais grave no níger, conhecida como mancha foliar de alternária. Após a microbiolização houve uma redução de 80%, indicando que os isolados de *Trichoderma* podem ajudar no controle de uma das principais doenças da cultura em questão. Estudo realizado por Cruz (2010) com sementes de melão tratadas com produtos biológicos à base de *Trichoderma* spp. apresentou resultados semelhantes no controle de *Alternaria* sp., onde reduziu em até 100% a incidência do fungo nas sementes, que inicialmente apresentaram 13% de incidência do fungo. Ambuse et al. (2012) observaram eficiência de cinco espécies de *Trichoderma* sp. no controle de *Alternaria tenuissima*, e constataram que as espécies utilizadas reduziram o crescimento micelial do patógeno em até 80%.

Em relação à *Sphacelia* sp., após a microbiolização constatou-se uma redução em sua incidência, porém isso não aconteceu quando as sementes foram tratadas com o fungicida carbendazim + thiram. Isso pode ser explicado pelo fato de não se ter recomendação técnica para controle desse fungo em sementes de níger, podendo ter sido utilizada uma baixa dosagem do produto. Nogueira et al. (2002) avaliando a ação de fungicidas no controle da germinação de conídios *Claviceps africana* (*Sphacelia sorghi* McRae), observaram diferenças entre os fungicidas avaliados na inibição da

germinação de conídios, e que esta é dependente da concentração do fungicida usado.

Para *Fusarium* sp., os isolados de *Trichoderma* proporcionaram redução da incidência do patógeno em 70%, constatando que estes podem ser eficientes para controle deste fungo nas sementes. Carvalho et al. (2011), trabalhando com seis isolados de *T. harzianum* no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro comum, observaram redução na incidência do patógeno em sementes microbiolizadas, de 47% na testemunha para 23% nas sementes tratadas; ressalta-se que, nesse caso, a incidência inicial era alta.

Dubey et al. (2007), verificaram o controle *in vivo* de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* em sementes de ervilha ao realizar a microbiolização com conídios de *Trichoderma* spp.

Os resultados referentes a germinação das sementes, emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência (IVE) estão na Tabela 8. Os três isolados de *Trichoderma* testados na microbiolização das sementes não modificaram a expressão das variáveis germinação, emergência e IVE. O fungicida utilizado também manteve os mesmos valores da testemunha.

Tabela 8. Germinação em papel (Germ.), emergência em areia (Emerg.) e índice de velocidade de emergência (IVE), em sementes de *Guizotia abyssinica* em função da microbiolização com isolados de *Trichoderma* sp. UFMT, Cuiabá, MT. 2012.

Tratamentos	Germ. (%)	Emerg. (%)	IVE
Testemunha	60,0 a	60,0 a	9,8 a
Fungicida*	61,0 a	59,0 a	8,7 a
<i>Trichoderma</i> spp. (isol. soja)	59,6 a	54,5 a	7,5 a
<i>Trichoderma</i> spp. (isol. trigo)	56,0 a	55,5 a	8,1 a
<i>Trichoderma</i> spp. (isol. quinoa)	59,0 a	54,5 a	8,4 a
CV (%)	7,6	12,0	12,0

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. *carbendazim + thiram 200 g i.a. 100 kg⁻¹ de sementes.

Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores, onde a microbiolização com *Trichoderma* spp. não causou alteração no comportamento germinativo nas sementes de diversas espécies botânicas, como soja (MERTZ et al., 2009), melão (CRUZ 2010), milho (LUZ, 2001) e pimenta (DINIZ et al., 2009).

Esses resultados discordam de dados obtidos em trabalho conduzido com sementes de algodão, nos quais sementes tratadas com isolados do agente biológico *Trichoderma harzianum* apresentaram desempenho semelhante às sementes tratadas com os fungicidas químicos carboxin+thiram e carbendazin+thiram, possibilitando maiores germinação e emergência quando comparadas à testemunha (FARIA et al., 2003). Em sementes de tomate, Martelleto (2005) observou o efeito expressivo do *Trichoderma* sp., melhorando os índices de germinação das sementes e o percentual de plântulas normais. A ação desse bioprotetor está ligada ao controle de fungos patogênicos de sementes que causam má germinação, início ou aumento de inóculo de patógenos que facilitam o desenvolvimento de doenças em sementes, em plântulas e em planta adulta (LUZ, 2001).

O fato de o níger possuir germinação muito rápida, visto que no terceiro dia, aproximadamente 80% das sementes já estavam germinadas, pode ter contribuído para que os tratamentos não se diferissem da testemunha, tanto na germinação quanto na emergência das plantas.

Em relação à altura e massa seca de plantas houve diferença de comportamento (Tabela 9). Verificou-se maior altura e maior acúmulo de matéria seca de plantas nos tratamentos com fungicida e com *Trichoderma* sp.

Tabela 9. Altura de plantas (AP) e massa seca de plantas (MSP) de *Guizotia abyssinica* após microbiolização das sementes com *Trichoderma* sp. UFMT, Cuiabá, MT. 2012.

Tratamentos	AP (cm)	MSP (g)
Testemunha	3,6 b	6,7 b
Fungicida*	4,1 a	8,2 a
<i>Trichoderma</i> spp. (isol. soja)	4,5 a	8,2 a
<i>Trichoderma</i> spp. (isol. trigo)	4,2 a	8,2 a
<i>Trichoderma</i> spp. (isol. quinoa)	4,3 a	8,4 a
CV (%)	5,7	5,3

As medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade. *carbendazim + thiram 200 g i.a. 100 kg⁻¹ de sementes.

Segundo Baker (1991), o uso de espécies de *Trichoderma* pode trazer benefícios à planta, pois o fungo pode agir no controle de patógenos secundários que poderiam afetar negativamente as raízes das plantas, além da produção de fatores estimulantes de crescimento.

Esses resultados são confirmados por diversos autores (YEDIDIA et al., 2001; DINIZ et al., 2006; ETHUR et al., 2006; BEGUM et al., 2010) que constataram os benefícios de *Trichoderma* spp. no tratamento de sementes de diversas culturas agrícolas (pimentão, alface, nabo forrageiro e pepino, respectivamente), que apresentaram aumento de crescimento da parte aérea, e como consequência, maior massa seca de plantas; no caso do pimentão foi observado melhora na produtividade. Esses resultados indicam que espécies de *Trichoderma* podem apresentar efeitos benéficos às plantas, com aumento no desenvolvimento e vigor das mesmas, agindo como promotor de crescimento em espécies agrícolas, inclusive o níger.

5. CONCLUSÕES

O aperfeiçoamento do método de incubação em papel de filtro modificado com restritores hídricos foi eficaz em sementes de níger.

O soluto KCl no potencial de $-1,2$ MPa apresentou as maiores porcentagens de redução na germinação e menor comprimento de raiz primária.

Plantas de níger, oriundas de sementes microbiolizadas com *Trichoderma* sp., apresentaram maior altura e massa de matéria seca; houve também redução na incidência de fungos nas sementes com o uso desta técnica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBUSE, M. G.; CHATAGE, V. S.; BHALE, U. N. Influence of *Trichoderma* spp against *Alternaria tenuissima* inciting leaf spot of *Rumex acetosa* L. **Bioscience Discovery**, v. 3, n.2, p. 259-262, 2012.

ARAÚJO, A.E.; MENTEN, J.O.M.; DIAS, C.T.S. et al. Efeito de restritores hídricos sobre a germinação, comprimento da radícula e níveis de detecção de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n.1, p. 79-83, 2012.

ARAÚJO, A.E.; CASTRO, A.P.G.; ROSSETTO, C.A.V. Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 45-54, 2004.

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

BAKER, R. Diversity in biological control. **Crop Protection**, v.10, n. 3, p.85-94, 1991.

BALAKRISHNAN, B. R.; THENMOZHI, S.; DWIVEDI, S. Responses of phyto-hormones in growth profile of *Guizotia abyssinica* (L.F.) Cass. (Niger). **Life Science Leaflets**, v. 11, n. 2, p. 305-316, 2011.

BARBA, J.T.; REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. Comparação de métodos para detecção de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de cevada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 389-394, 2002.

BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.M. Introdução a patologia de sementes e testes convencionais de sanidade de sementes para a detecção de fungos fitopatogênicos. **Informativo Abrates**, v. 20, n.3, p. 74-75, 2010.

BRACCINI, A.L., RUIZ, H.A., BRACCINI, M.C.L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietilenoglicol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.18, n.1, p.10-16, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BEGUM, M. F.; RAHMAN, M. A.; FIROZ ALAM, M. Biological control of alternaria fruit rot of chili by *Trichoderma* species under field conditions. **Mycobiology**, v. 38, n.2, p.113-117, 2010.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle de fitopatógenos**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 165p.

CAMPOS, L.S.; ASSUNÇÃO, M.V. Estresse salino e hídrico na germinação e vigor de sementes de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 6, p. 857-862, 1990.

CARNEIRO, M.A.C.; CORDEIRO, M.A.S.; ASSIS, P.C.R. et al. Produção de fitomassa de diferentes espécies de cobertura e suas alterações na atividade microbiana de solo de cerrado. **Bragantia**, v. 67, n. 2, p. 455-462, 2008.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p. 2000.

CARVALHO FILHO, M. R.; MELLO, S. C.; SANTOS, R. P. et al. 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**. EMBRAPA recursos genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2008.

CARVALHO, E.M.; SILVA, U.A.; RODRIGUES, D.C.G.A. Uso da restrição hídrica na detecção de *Alternaria dauci* e *Alternaria radicina* em sementes de cenoura (*Daucus carota*). **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, 2009.

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

CELANO, M. M.; MACHADO, J. C.; JACCOUD FILHO, D. S. et al. Avaliação do potencial de uso da restrição hídrica em teste de sanidade de sementes de trigo visando à detecção de fungos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 613-618, 2012.

CHET, I. *Trichoderma* – application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogen fungi. In: **Innovative Approaches to Plant Disease Control** (I. Chet, ed.), John Wiley, 1987. p.137-160.

COSTA, M. L. N.; MACHADO, M.L.N.; GUIMARÃES, J. C. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n.5, p.1023-1030, 2003.

COUTINHO, W.C. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. 2000. 78f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2000.

COUTINHO, W.C.; MACHADO, J.C.; VIERIA, M.G.G.C. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e

feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p.127-135, 2001.

CRUZ, J. L. G. **Efeito de *trichoderma* spp. no potencial fisiológico de sementes e mudas de melão**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2010.

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

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

DINIZ, K. A.; SILVA, P.A; OLIVEIRA, J.A. et al. Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators. **Scientia Agricola**, v. 66, n.3, p. 293-297, 2009.

DHINGRA, O. D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: FALLEIRO, B. A. de S.; ALMEIDA, P. B. de A.; COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D.; KOBAYASTI, L. Use of osmotic solutions for inhibition of sunflower seed germination in blotter test. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 6, 2010.

DUBEY S.C.; SURESH M.; SINGH B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*for integrated management of chickpea wilt. **Biological Control**, v. 33, n. 40, p.118-127, 2007.

ETEBARIAN, H.R.; SCOTT, E.S.; WICKS, T.J. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potencial biological control agent for *Phytophthora eryth roseptica*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 3, p. 329 – 337, 2000.

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

FALLEIRO, B. A. S.; ALMEIDA, P. B. A.; COUTINHO, W. M. et al. Use of osmotic solutions for inhibition of sunflower seed germination in blotter test. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 6, p. 343-350, 2010.

FARIA, A. Y. K.; ALBUQUERQUE, M. C. de F.; CASSETARI NETO, D. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos

químico e biológico. **Revista Brasileira Sementes**, v. 25, n.1, p.121-127, 2003.

FARIAS, C.J.; DEL PONTE, E.M.; DAL MAGRO, T. et al. Inibição de germinação de sementes de trigo e milho em teste de sanidade em substrato de papel. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 141-144, 2003.

FERREIRA, D. F. Sisvar – programa estatístico. Versão 4.2 (Build 39). Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999.

GARCIA J., D.; VECHIATO, M.H.; MENTEN, J. O.M. Comparação de métodos para a detecção de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.). **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p.164-167, 2008.

GASPAROTTO, F. et al. Eficiência de métodos para detecção de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 397- 402, 2009.

GELETA, M.; BRYNGELSSON, T.; BEKELE, E.; DAGNE, K. Genetic diversity of *Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass..(Asteraceae) from Ethiopia as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 3, p. 601–614, 2007.

GETINET, A.; SHARMA, S. M. **Niger (*Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Inst. Plant Genet. Crop Plant Res., Gatersleben/Int. Plant Genetic Resource. Inst., Rome. 1996.

GORDIN, C.R.B.; MARQUES, R. F.; MASETTO, T. E. et al. Estresse salino na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de niger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 966-972, 2012.

HERMOSA, M.R., GRONDONA, I., ITURRIAGA, E.A. et al. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n.5, p. 1890-1898, 2000.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**. n. 84, n.2, p. 377-93, 2000.

HARMAN, G.E., HOWELL, C.R.; VITERBO, A. et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n. 2, p. 43-56, 2004.

KANDEL, H. J.; PORTER, P. M.; JOHNSON, B.L. et al. Plant population influences niger seed yield in the northern great plains. **Crop Science**, v. 44, n. 1, p. 190-194, 2004.

LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. V. 1. Embrapa Soja, Londrina, Paraná, 2005.

LIMONARD, T. Ecological aspects of seed health testing. **Proceeding of International Seed Testing Association**, v. 33, n. 2, p. 343-513, 1968.

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

LUCON, C.M.M.; KOIKE, C.M.; ISHIKAWA, A.I. et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.3, p.225-232, 2009.

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

LUZ, W.C. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA. Cap.3, p.25-31. 1991.

LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. In: LUZ, W.C. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 33-70, 1993.

LUZ, W. C. Microbiolização das sementes: uma comparação com o tratamento químico no controle dos principais patógenos das sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, ed. esp., 1998a.

LUZ, W.C. da & PEREIRA, L.R. Tratamento de sementes com fungicidas relacionado com o controle de patógenos e rendimento de milho. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 537-541, 1998b.

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

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106p.

MACHADO, J. da C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MACHADO, JC.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C. et al. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 2, p.77-81, 2003.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C. et al. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n.2, p. 77-81, 2004.

MACHADO, A.Q.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.D.G.G.C. et al. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.3, p. 408-414, 2007.

MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; COSTA, M.L.N. et al. Uso da técnica de restrição hídrica ou “condicionamento osmótico” em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 1-24, 2012.

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

MARQUES, R.F.; GORDIN, C.R.B.; MASETTO, T.E.; et al. Germinação de sementes de *Guizotia abyssinica* Cass. em condições de salinidade. In: XVII Congresso brasileiro de sementes, 2011, Natal - RN. **Informativo Abrates**. Londrina: Abrates, v. 21. n. 2. p. 146-146, 2011a.

MARQUES, R.F.; GORDIN, C.R.B.; MASETTO, T.E.; et al. Estresse hídrico na germinação de sementes de *Guizotia abyssinica* Cass. In: XVII Congresso brasileiro de sementes, 2011, Natal - RN. **Informativo Abrates**. Londrina: Abrates, v. 21. n. 2. p. 146-146, 2011b.

MARTELLETO, M. S. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o tratamento de sementes de tomate visando a proteção contra patógenos de solo e de armazenamento e promoção de crescimento**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2005.

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

MENTEN, J. O. M. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, Gramado, RS. **Anais**. p. 3-23.1996.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p. 13-18, 2009.

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D.A. Computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v. 87, n. 1, p. 126-130, 1995.

MISSIO, V. C. et al. Avaliação do potencial fungitóxico do extrato bruto da planta medicinal citronela (*Cymbopogon nardus*) no tratamento de sementes de feijoeiro. **Informativo Abrates**, Londrina, v.13, n.3, p. 72 2003.

MORANDI et al. Controle biológico de pragas, doenças e plantas invasoras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n. 251, p.73-82. Jul./ago. 2009.

MURTHY, H. N.; HIREMATH, S. C.; SALIMATH, S. S. Origin evolution and genome differentiation in *Guizotia abyssinica* and its wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, n. 5, p. 587-592. 1993.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p.49-85, 1994.

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A.; LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Phytium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.161-1699, 2000.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London: MacMillan, v. 2, 1191p. 1979.

NETTO, D.A.M. & FAIAD, M.G.R. Viabilidade e sanidade de sementes florestais tropicais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n.1, p.75-80, 1995.

NETTO, D.M.; PINTO, N.F.J.A.; OLIVEIRA, A.C. et al. Qualidade Fisiológica e Sanitária de Sementes de Sorgo Danificadas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 134-140, 1998.

NOGUEIRA, S.R.; CASTRO, H.A.; GOMES, A.C.M. Efeito de fungicidas na germinação in vitro de conídios de *Claviceps africana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, 2002.

PARREIRA, D, F.; EVES, W, S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de Fungos a Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 2, p. 24, 2009.

POPINIGIS, F. Fisiologia da Semente. Brasília: Agiplan, 1977. 289p.

RAJPUROHIT, T.S. Diseases of niger and their management. **Plant Sciences Feed**, v. 1, n. 2, p. 19-22, 2011.

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

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

ROTEM, J. **The genus Alternaria**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1994. 326 p.

SANOGO, R. C.; POMELLA, A.; HERBAR, P. K.; et al. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis peniciosa* on cocoa. **Phytopatology**, v. 92, n. 10, p. 1032-1037, 2002.

SANTAELLA, A. G.; ADORIAM, A. I.; KLOSTLER, G. S.; KOBAYASTI, L. Fungos associados a sementes de Niger (*Guizotia abyssinica* - Asteraceae). In: 44º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2011, Bento Gonçalves. **Resumos...**Tropical Plant Pathology, 2011. p. 865-865.

SARIN, R.; SHARMA, M.; KHAN, A. A. Studies on *Guizotia abyssinica* L. oil: biodiesel synthesis and process optimization. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 4187-4192, 2009.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; et al. Biological control of the rootknot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, v. 91, n. 7, p. 687-693, 2001.

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

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, K. Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 235, n. 2, p. 235- 242, 2001.

ZAUZA, E.A.V. ; ALFENAS, A.C. ; MAFIA, R.G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Eds.). Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, 2007. p. 23 – 51.