

## QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE MILHO COM ASSOCIAÇÃO DE MICROBIOLIZAÇÃO E TRATAMENTO QUÍMICO

Bianca Artoni Martins<sup>1</sup>; Weliton Lucas Benites<sup>1</sup>; Luana de Carvalho Catelan<sup>1</sup>;  
Lucas Roberto Ruiz Passamani<sup>1</sup> e Nádia G. Krohn<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá – UEM – Centro de Ciências Agrárias, Depto. de Ciências Agronômicas – Umuarama, PR; email: [nadiakrohn@yahoo.com.br](mailto:nadiakrohn@yahoo.com.br)<sup>2</sup>

**RESUMO:** *Analisou-se a eficácia do tratamento de sementes com a microbiolização, ou seja, o uso de microrganismos, em sementes de milho em comparação com o tratamento convencional, usando fungicida, além do efeito protetor de biopolímero sobre o tratamento biológico. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x5. Avaliou-se a interação da presença ou ausência do biopolímero, que visa proteger e potencializar o tratamento biológico; com a presença ou ausência de tratamento fungicida; e com os tratamentos biológicos, testemunha (tratamento biológico ausente), Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens e Trichoderma harzianum. Determinou-se eficiência dos tratamentos pela qualidade fisiológica das sementes com o teste de germinação, de comprimento e de massa seca de plântulas, bem como controle de patógenos dos mesmos, avaliado pelo teste de sanidade. Tratamentos biológicos, fungicida e biopolímero não aumentaram o vigor e a viabilidade de sementes. O fungicida teve efeito negativo sobre A. brasilense, para vigor e viabilidade, e o biopolímero teve efeito protetor sobre este microrganismo. A associação de fungicida com B. subtilis aumentou a massa seca de plântula. O fungicida foi eficiente no controle de fungos, o mesmo não foi observado para os tratamentos biológicos.*

**PALAVRAS-CHAVE:** vigor, tratamento biológico, patologia de sementes.

## PHYSIOLOGICAL AND SANITARY QUALITY OF CORN SEEDS WITH ASSOCIATION OF MICROBIOLIZATION AND CHEMICAL TREATMENT

**ABSTRACT:** *Seed treatment with microbiolization, that is, the use of microorganisms, in corn seeds in comparison with conventional treatment using fungicide, besides, the protective effect of biopolymer on biological treatment was evaluated. The experiment was carried out in a completely randomized design, in a 2x2x5 factorial scheme. It was evaluated an interaction of presence or absence of biopolymer, which aims to protect and potentiate biological treatment; With a presence or absence of fungicide treatment; And with the biological treatments, control (biological treatment absent), Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens and Trichoderma harzianum. It was determined the efficiency of the treatments by physiological quality of the seeds with germination test, length and mass of plants, as well as control of pathogens of the same, evaluated by sanity test. Biological treatments, fungicides and biopolymers did not increase seed vigor and viability. Fungicide had a negative effect on A. brasilense, for vigor and viability, and the biopolymer had a protective effect on this microorganism. Association of fungicide with B. subtilis increased dry mass of seedlings. The fungicide was efficient in the control of fungi, the same was not observed for the biological treatments.*

**KEYWORDS:** vigor, biological treatment, seed pathology.

## INTRODUÇÃO

O milho é o cereal mais produzido e consumido no mundo, como insumo na produção de proteína animal, na alimentação humana e biocombustíveis. Segundo a CONAB (2016), a produção da safra 2015/2016 foi de 79,957 milhões de toneladas de milho.

As sementes são a principal forma de propagação das culturas destinadas à alimentação humana e animal (Henning, 2005). O uso de sementes de boa qualidade é determinante para o sucesso da semeadura, estando diretamente relacionada à produtividade e à lucratividade obtidas (Salum et al., 2008). As sementes são eficientes veículos de disseminação da maioria dos patógenos e, através delas, as doenças podem ser transportadas para pequenas e grandes distâncias, sendo introduzidas em novas áreas (Menten, 1995). Dentre os agentes patogênicos transmitidos pelas sementes de milho, merece destaque *Fusarium moniliforme*, sendo encontrados também *Helminthosporium maydis*, *Colletotrichum graminicola*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. A ocorrência de patógenos pode ser considerado como uma das causas que levam à perda da qualidade fisiológica das sementes, causando redução na germinação (Mertz et al., 2009). A baixa qualidade fisiológica de sementes pode resultar em reduções na velocidade e emergência total, desuniformidade de emergência, menor tamanho inicial de plântulas, de produção de matéria seca e da área foliar (Khah et al., 1989; Höfs et al., 2004; Kolchinski et al., 2006).

O controle de patógenos das sementes e a proteção das mesmas contra patógenos do solo é de fundamental importância. Contudo, deve-se considerar para tanto também o tratamento de sementes com agentes microbiológicos que podem ter efeito antagônico aos patógenos, por ser uma opção mais sustentável do ponto de vista ambiental. O termo microbiolização surgiu para definir o tratamento de sementes com tais agentes microbiológicos (Luz, 1990; Luz, 1991).

As bactérias diazotróficas são alternativas para a microbiolização de sementes. São microrganismos que realizam a conversão enzimática do nitrogênio gasoso em amônia. Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), alguns desses microrganismos também produzem substâncias promotoras de crescimento de plantas (Bergamaschi et al., 2007). Essas bactérias têm capacidade de colonizar raízes de plantas ou o ambiente ao seu redor, promovendo benefícios ao crescimento e/ou desenvolvimento das plantas, também são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento (Kloepper e Schroth, 1978). Dentre as bactérias encontradas em associação com cereais e gramíneas de

interesse agrícola, as espécies de *Azospirillum* têm sido as mais relatadas e estudadas em pesquisas científicas (Reis Junior et al., 2008). A fim de obter técnicas alternativas e eficientes de controle de patógenos, há motivos para acreditar que os mecanismos de ação das rizobactérias, responsáveis pela produção de compostos antibióticos, possam atuar na supressão de patógenos no solo. Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou a outras atividades metabólicas de outros organismos (Embrapa, 2005). No entanto, a comprovação da eficácia da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* na defesa contra patógenos da semente e do solo ainda não está definitivamente comprovada.

De maneira semelhante, *Trichoderma* sp. produz um amplo espectro de substâncias antibióticas e, além disso, parasita outros fungos (Harman et al., 2004). Adicionalmente, compete de forma mais eficiente com outros microrganismos, por alguns exsudatos liberados por sementes em germinação, os quais são responsáveis pela ativação de propágulos de patógenos vegetais (Howell, 2002). Em relação aos microrganismos do solo, o *Trichoderma* sp. compete com os mesmos por nutrientes e/ou espaço (Elad, 1996). Aliando todos os fatores citados anteriormente com a indução de resistência a doenças na planta, nota-se que o *Trichoderma* sp. poderia ser uma alternativa como inoculante de sementes visando a proteção contra patógenos da semente e do solo.

Outros microrganismos podem apresentar potencial como inoculantes, a saber *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis*, que já tiveram sua eficiência comprovada no controle de patógenos de sementes (Luz, 1998). No entanto, estudos são necessários para outras espécies de patógenos associados com sementes.

A realização do projeto de pesquisa objetivou estudar a eficiência de tratamentos de sementes com agentes biológicos, o efeito protetor de biopolímeros e a possibilidade de associação de tratamento biológico com o químico sobre a qualidade fisiológica e sanitária das sementes.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes da Universidade Estadual de Maringá, Campus Regional de Umuarama, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x5. Será avaliada a interação da presença ou

ausência de biopolímero, que visa proteger e potencializar o tratamento biológico; com a presença ou ausência de tratamento fungicida; e com os tratamentos biológicos, testemunha (tratamento biológico ausente), *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma harzianum*.

Utilizou-se o biopolímero Protege TS<sup>®</sup> com 100 mL p.c. 100 kg<sup>-1</sup> de sementes. Para os tratamentos biológicos com *A. brasilense*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* foram utilizados os produtos Az Total<sup>®</sup>, Accelerate BS<sup>®</sup> e Accelerate PF<sup>®</sup>, respectivamente, com 100 mL p.c. 100 kg<sup>-1</sup> de sementes de cada um dos produtos, de acordo com o tratamento. Para o *T. harzianum* foram utilizados 3.10<sup>12</sup> UFC (unidades formadoras de colônia) 100 kg<sup>-1</sup> de sementes, o que corresponde a 33 g do produto Ecotrich<sup>®</sup> WP, diluídos em 300 ml de água destilada. Para o tratamento químico usou-se piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil (Standak Top<sup>®</sup>), com 200 ml p.c. 100 kg<sup>-1</sup> sementes. Para os tratamentos duplos e triplos, os produtos nas quantidades recomendadas foram aplicados concomitantemente nas sementes. Para cada tratamento, utilizou-se 200 g de sementes de milho do híbrido Pioneer 2866 H, tratadas em sacos plásticos, com agitação vigorosa para garantir a distribuição homogênea do produto.

Conduziu-se o teste de germinação entre substrato de papel (germitest), com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. As sementes foram distribuídas entre três folhas de papel germitest (duas folhas sob e uma sobre as sementes) umedecidas com volume de água destilada correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Em seguida, confeccionaram-se rolos e estes colocados em germinador regulado para manter a temperatura de 25 ± 2 °C. As avaliações foram realizadas no quarto (primeira contagem), avaliando-se o vigor, e no sétimo dia após a instalação do teste, avaliando-se a viabilidade, determinando a porcentagem de plântulas normais, conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a).

Determinou-se o comprimento de plântulas, conforme metodologia descrita por Nakagawa (1999), que consiste na semeadura de quatro repetições de 10 sementes, sobre linha traçada longitudinalmente no terço superior de papel substrato previamente umedecido conforme o descrito para o teste de germinação; os substratos, na forma de rolos e no interior de sacos plásticos, foram mantidos verticalmente à temperatura de 25 °C, para avaliação do comprimento da raiz primária, parte aérea e total das plântulas no sétimo dia após a semeadura.

A massa da matéria seca de plântulas foi determinada com as plântulas do teste anterior, com a remoção dos resquícios do tecido de reserva, acondicionadas em sacos de papel, e mantidos em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 65 °C por 24 horas. Obtiveram-se os resultados pela divisão da massa da amostra pelo número de plântulas normais (Nakagawa, 1999).

O método do papel filtro (*blotter test*) foi conduzido, de acordo com o descrito em Brasil (2009b) para avaliar a sanidade das sementes antes e após a aplicação dos diferentes tratamentos, sendo analisadas quatro repetições de cem sementes cada. As sementes, em total de 25, foram dispostas isoladamente, a uma distância de um centímetro umas das outras, sobre três folhas de papel de germinação, umedecido com água destilada (volume igual a 2,5 vezes a massa do papel), em caixa *gerbox*. Dessa maneira, cada repetição do teste era composta por quatro caixas *gerbox*. Transferiu-se os recipientes com as sementes para BOD, com lâmpadas de luz fluorescente branca, com fotoperíodo de 12 horas, durante oito dias, a temperatura de  $20 \pm 2$  °C. Após a incubação examinou-se as sementes individualmente com auxílio de um estereomicroscópio com aumento de 40X. Observou-se as ocorrências de frutificações típicas do crescimento de fungos para identificação das espécies presentes na amostra. Além disso, foram preparadas lâminas com as estruturas dos fungos para a verificação, com o auxílio do microscópio ótico, da espécie em questão. Os resultados foram expressos em percentual de ocorrência dos fungos nas sementes.

Os dados do trabalho foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa estatístico SISVAR - Versão 5.3 (Ferreira, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analizando-se a variável vigor, avaliada pelo teste de germinação (Tabela 1), notou-se que houve interação dupla significativa entre os fatores fungicida e tratamento biológico, e da tripla entre tratamento biológico, químico e biopolímero. O teste de germinação é realizado para se determinar o vigor e a viabilidade das sementes, esta indica a porcentagem de sementes com capacidade de germinar, e o vigor representa a germinação e emergência de plântulas de forma uniforme e em curto período de tempo (Marcos Filho, 2015).

Para a maioria dos tratamentos biológicos associados ao fungicida não foi constatada influência da presença ou ausência do biopolímero, apenas quando se associou o tratamento biológico *A. brasilense* e fungicida, observou-se maior vigor das sementes com o uso do biopolímero (Tabela 1). Quando se utilizou fungicida, na ausência do biopolímero, e se comparou os tratamentos biológicos, percebeu-se que dentre estes que o *A. brasilense* foi o que apresentou menor porcentagem de vigor.

Na ausência do fungicida, não se constatou diferença no vigor na ausência ou na presença de biopolímero, dentro de cada tratamento biológico (Tabela 1). Quando se comparou os tratamentos biológicos, na ausência do fungicida com o uso apenas do biopolímero, o tratamento biológico com *T. harzianum* apresentou maior vigor em relação ao tratamento com *P. fluorescens*, porém estes não diferiram dos demais tratamentos. Já na ausência de biopolímero não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Nos tratamentos com biopolímero comparando-se a presença ou ausência de fungicida, a testemunha apresentou maior vigor com o uso de fungicida do que sem, e os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística (Tabela 1). Já na ausência do biopolímero fazendo comparação com o uso ou não de fungicida, o tratamento com *A. brasilense* teve maior porcentagem de vigor na ausência de fungicida, portanto, o fungicida possivelmente apresenta efeitos negativos sobre esse microrganismo, diminuindo a população utilizada no tratamento, e diminuindo os potenciais efeitos sobre o vigor.

O biopolímero provavelmente apresenta efeito protetor sobre o *A. brasilense* pois com o uso do primeiro não se observou a diferença no vigor com o uso ou não de fungicida associado ao tratamento biológico em questão. Cassán et al. (2009) afirmaram que a inoculação com *A. brasilense* influencia na germinação de sementes, pois esses microrganismos induzem a produção de hormônios vegetais, como auxina e giberelina, contribuindo com maior vigor das sementes, e também promove o crescimento de plantas.

**Tabela 1** – Vigor (%) avaliada pelo teste de germinação de sementes de milho com microbiolização associada com fungicida e biopolímero

	Tratamento biológico	Biopolímero	
		Com	Sem
Com fungicida	Ausente	98,50 Aa	97,50 Aa
	<i>A. brasilense</i>	92,50 Aa	79,50 Bb
	<i>B. subtilis</i>	93,00 Aa	94,00 Aa
	<i>P. fluorescens</i>	93,50 Aa	96,50 Aa
	<i>T. harzianum</i>	94,00 Aa	98,00 Aa
Sem fungicida	Ausente	92,00 ABa	95,00 Aa
	<i>A. brasilense</i>	93,50 ABa	98,00 Aa
	<i>B. subtilis</i>	96,00 ABa	98,00 Aa
	<i>P. fluorescens</i>	89,50 Ba	95,00 Aa
	<i>T. harzianum</i>	98,00 Aa	93,50 Aa
	Tratamento biológico	Fungicida	
		Com	Sem
Com biopolímero	Ausente	98,50 a	92,00 b
	<i>A. brasilense</i>	92,50 a	93,50 a
	<i>B. subtilis</i>	93,00 a	96,00 a
	<i>P. fluorescens</i>	93,50 a	89,50 a
	<i>T. harzianum</i>	94,00 a	98,00 a
Sem biopolímero	Ausente	97,50 a	95,00 a
	<i>A. brasilense</i>	79,50 b	98,00 a
	<i>B. subtilis</i>	94,00 a	98,00 a
	<i>P. fluorescens</i>	96,50 a	95,00 a
	<i>T. harzianum</i>	98,00 a	93,50 a
Fc Biopolímero (B)		0,256 <sup>ns</sup>	
Fc Fungicida (F)		1,669 <sup>ns</sup>	
Fc Trat. biol. (T)		4,459 <sup>ns</sup>	
Fc B x F		3,435 <sup>ns</sup>	
Fc B x T		2,424 <sup>ns</sup>	
Fc F x T		8,112**	
Fc B x F x T		5,478**	
CV %		4,22	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; Fc: valor de F calculado; \*\*, \* e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo pelo teste t, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

Considerando-se a variável viabilidade avaliada pelo teste de germinação (Tabela 2) percebe-se que houve interação tripla significativa do uso de biopolímero, fungicida e tratamento biológico. Quando se associou o tratamento fungicida com biopolímero, e se comparou os tratamentos biológicos constatou-se que os mesmos não diferiram entre si. No entanto, sem o uso de biopolímero, o tratamento com *A. brasilense* apresentou menor germinação quando comparado aos demais tratamentos, com exceção do *B. subtilis*, que apresentou germinação intermediária.

Dentro do tratamento fungicida, associado com os diferentes tratamentos biológicos, fazendo-se a comparação entre o uso ou não de biopolímero, o tratamento com *A. brasilense* apresentou resultado inferior na ausência de biopolímero (Tabela 2), confirmando que este microrganismo é afetado pela ação do tratamento químico, e o biopolímero tem efeito protetor sobre ele, conforme já discutido para o vigor de sementes. Para os demais tratamentos não se observou diferença estatística com o uso ou não do biopolímero.

**Tabela 2** – Viabilidade (%) avaliada pelo teste de germinação de sementes de milho com microbiolização associada com fungicida e biopolímero

	Tratamento biológico	Biopolímero	
		Com	Sem
Com fungicida	Ausente	98,50 Aa	98,00 Aa
	<i>A. brasilense</i>	97,50 Aa	90,50 Bb
	<i>B. subtilis</i>	97,00 Aa	96,50 ABa
	<i>P. fluorescens</i>	99,00 Aa	98,50 Aa
	<i>T. harzianum</i>	96,00 Aa	98,00 Aa
Sem fungicida	Ausente	97,00 Aa	97,50 Aa
	<i>A. brasilense</i>	95,50 Aa	98,50 Aa
	<i>B. subtilis</i>	98,50 Aa	98,00 Aa
	<i>P. fluorescens</i>	95,50 Aa	97,50 Aa
	<i>T. harzianum</i>	98,00 Aa	93,50 Aa
	Tratamento biológico	Fungicida	
		Com	Sem
Com biopolímero	Ausente	98,50 a	97,00 a
	<i>A. brasilense</i>	97,50 a	95,50 a
	<i>B. subtilis</i>	97,00 a	98,50 a
	<i>P. fluorescens</i>	99,00 a	95,50 a
	<i>T. harzianum</i>	96,00 a	98,00 a
Sem biopolímero	Ausente	98,00 a	97,50 a
	<i>A. brasilense</i>	90,50 b	98,50 a
	<i>B. subtilis</i>	96,50 a	98,00 a
	<i>P. fluorescens</i>	98,50 a	97,50 a
	<i>T. harzianum</i>	98,00 a	93,50 a
Fc Biopolímero (B)		0,621 <sup>ns</sup>	
Fc Fungicida (F)		0,000 <sup>ns</sup>	
Fc Trat. biol. (T)		1,321 <sup>ns</sup>	
Fc B x F		0,845 <sup>ns</sup>	
Fc B x T		0,394 <sup>ns</sup>	
Fc F x T		1,627 <sup>ns</sup>	
Fc B x F x T		3,011 <sup>**</sup>	
CV %		3,51	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; Fc: valor de F calculado; \*\*, \* e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo pelo teste t, respectivamente; CV: coeficiente de variação.



Ainda em relação à viabilidade, na ausência do tratamento fungicida, não se observou diferença estatística entre os tratamentos biológicos, e entre o uso ou não de biopolímero (Tabela 2). No desdobramento de fungicida, dentro do nível com biopolímero e tratamento biológico não se observou diferença estatística entre o uso ou não do fungicida. Quando não se utilizou biopolímero, no tratamento com *A. brasiliense* obteve-se maior viabilidade quando não se utilizou fungicida. *A. brasiliense* é protegido pelo biopolímero do efeito do fungicida, que provavelmente apresenta ação negativa sobre esse tratamento biológico, assim como verificou-se para a variável vigor (Tabela 1). Dessa maneira, com a população reduzida de *A. brasiliense*, a viabilidade das sementes foi menor, pois essa bactéria tem efeito que induz a germinação pela produção de giberelina (Cassán et al., 2009).

Para a variável plântulas anormais não houve diferença significativa, ou seja, os tratamentos não danificaram nenhuma estrutura das sementes, não causando fitotoxidez. Brand et al. (2009) constataram que o tratamento com bioprotetor e fungicida também não exerceram influência sobre o percentual de plântulas anormais. Já para a variável sementes mortas o único fator significativo foi o biopolímero, sendo que com o uso deste pode-se observar 1,25% sementes mortas, e 0,5% sementes mortas sem o uso de biopolímero. O biopolímero utilizado no trabalho é composto de moléculas de reconhecimento planta x bactéria, complexo de açúcares e biopolímeros encapsulantes. Portanto, a presença do complexo de açúcares pode ter servido de fonte de nutrientes para o crescimento de patógenos da semente, explicando o maior número de sementes mortas com o uso do biopolímero.

O desempenho de plântulas pode ser avaliado pelo comprimento (Tabela 3) e massa seca (Tabela 4) das mesmas. Na avaliação do comprimento de plântula (Tabela 3), houve significância dos fatores isolados, interação dupla significativa entre fungicida e tratamento biológico, e de biopolímero com tratamento biológico, e por fim, a interação tripla de biopolímero, fungicida e tratamento biológico.

Analisando-se o desdobramento de biopolímero dentro do nível com fungicida e tratamento biológico (Tabela 3) verificou-se, para os tratamentos com *P. fluorescens* e *T. harzianum*, maior comprimento de plântulas com o uso de biopolímero, provavelmente o mesmo teve efeito protetor sobre o *T. harzianum* e o *P. fluorescens* da ação do fungicida. De maneira contraditória, *B. subtilis* com fungicida e sem biopolímero apresentou maior crescimento de plântula. Para testemunha e *A. brasiliense* não se constatou diferença significativa com o uso ou não de biopolímero.

Quando se utilizou fungicida e biopolímero comparando-se os tratamentos biológicos (Tabela 3), *B. subtilis* teve menor comprimento de plântula em comparação aos demais tratamentos, portanto para tratamento com *B. subtilis* é recomendável não se utilizar biopolímero. Com o uso do fungicida e na ausência de biopolímero confrontando os tratamentos biológicos, a testemunha apresentou maior comprimento de plântula que o tratamento com *T. harzianum*, porém ambos não diferiram dos outros tratamentos.

Analizando os tratamentos biológicos sem fungicida, comparando a ausência com a presença de biopolímero, apenas a testemunha teve desempenho inferior sem a utilização do mesmo (Tabela 3), este provavelmente teve efeito positivo sobre a testemunha possibilitando maior crescimento de plântulas. Nos tratamentos sem fungicida e com biopolímero verificou-se que a testemunha apresentou maior comprimento de plântula que os demais tratamentos biológicos. Um trabalho realizado por Brand et al. (2009) mostrou que tratamento de fungicida combinado com bioprotetor e *Trichoderma* spp. influenciam positivamente no comprimento de plântulas.

Quando não se utilizou fungicida e não se utilizou biopolímero o tratamento que apresentou maior comprimento de plântula foi o tratamento com *T. harzianum*, em comparação com a testemunha que apresentou o menor comprimento, sendo que ambos não diferiram dos demais tratamentos (Tabela 3). Ao se analisar o desdobramento de fungicida dentro de biopolímero e tratamento biológico *A. brasilense*, *P. fluorescens* e *T. harzianum* apresentaram maiores comprimentos com fungicida em comparação quando este não foi utilizado.

O desdobramento de fungicida, com tratamento biológico e na ausência de biopolímero a testemunha apresentou maior média na presença de fungicida do que na ausência deste (Tabela 3). No entanto, para o tratamento com *T. harzianum* constatou-se que o mesmo expressou maior comprimento de plântula quando não se utilizou o fungicida. O *Trichoderma* spp. após o estabelecimento da interação com a planta, tem a capacidade de induzir a produção de hormônios na mesma, que permitem melhor assimilação de nutrientes e água, tendo um papel de bioestimulante sobre o crescimento de plantas, uma vez que esse microrganismo interage com as raízes, promovendo maior desenvolvimento das mesmas, assim, este microrganismo pode ser utilizado como promotor de crescimento e desenvolvimento de plantas (Pereira, 2012).

**Tabela 3** – Desempenho de plântulas, originadas de sementes de milho com microbiolização associada com fungicida e biopolímero, avaliado pelo comprimento total (cm)

	Tratamento biológico	Biopolímero	
		Com	Sem
Com fungicida	Ausente	37,42 Aa	36,86 Aa
	<i>A. brasilense</i>	35,78 Aa	36,08 ABa
	<i>B. subtilis</i>	33,14 Bb	34,99 ABa
	<i>P. fluorescens</i>	37,58 Aa	35,00 ABb
	<i>T. harzianum</i>	36,98 Aa	33,55 Bb
Sem fungicida	Ausente	37,80 Aa	33,39 Bb
	<i>A. brasilense</i>	34,05 Ba	35,63 ABa
	<i>B. subtilis</i>	35,17 Ba	34,90 ABa
	<i>P. fluorescens</i>	34,48 Ba	34,33 ABa
	<i>T. harzianum</i>	35,10 Ba	36,25 Aa
	Tratamento biológico	Fungicida	
		Com	Sem
Com biopolímero	Ausente	37,25 a	38,00 a
	<i>A. brasilense</i>	36,00 a	34,00 b
	<i>B. subtilis</i>	33,25 a	35,00 a
	<i>P. fluorescens</i>	37,75 a	34,50 b
	<i>T. harzianum</i>	37,25 a	35,25 b
Sem biopolímero	Ausente	37,00 a	33,25 b
	<i>A. brasilense</i>	36,25 a	35,50 a
	<i>B. subtilis</i>	35,25 a	35,00 a
	<i>P. fluorescens</i>	35,25 a	34,25 a
	<i>T. harzianum</i>	33,75 b	36,25 a
Fc Biopolímero (B)		4,3490*	
Fc Fungicida (F)		4,0252*	
Fc Trat. biol. (T)		3,4012*	
Fc B x F		0,5627 <sup>ns</sup>	
Fc B x T		4,4434**	
Fc F x T		3,1995*	
Fc B x F x T		5,9503**	
CV %		3,95	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; Fc: valor de F calculado; \*\*, \* e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo pelo teste t, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

Para o desempenho de plântulas avaliado pelo teste de massa seca (Tabela 4), observou-se que houve interação significativa entre fungicida e tratamento biológico. Não se constatou diferença entre os tratamentos biológicos, independente dos mesmos estarem associados ou não ao fungicida. No entanto, ao se fazer a comparação da ausência e da presença de fungicida nos tratamentos, percebe-se que para o tratamento biológico com *B. subtilis* ocorreu maior massa seca quando foi utilizado fungicida. Isto indica que com a utilização do tratamento químico diminui-se a incidência de patógenos

(Tabela 5) nas sementes, e sem a influência negativa dos fungos ocorreu maior crescimento e acúmulo de massa seca nas plântulas, após a germinação.

**Tabela 4** – Desempenho de plântulas, originadas de sementes de milho com microbiolização associada com fungicida e biopolímero, avaliado pela massa seca (mg plântula<sup>-1</sup>)

Tratamento biológico	Fungicida	
	Com	Sem
Ausente	104,71 Aa	103,76 Aa
<i>A. brasilense</i>	109,61 Aa	102,70 Aa
<i>B. subtilis</i>	108,47 Aa	99,00 Ab
<i>P. fluorescens</i>	101,26 Aa	108,05 Aa
<i>T. harzianum</i>	106,97 Aa	102,97 Aa
Fc Biopolímero (B)	1,020 <sup>ns</sup>	
Fc Fungicida (F)	2,753 <sup>ns</sup>	
Fc Trat. biol. (T)	0,213 <sup>ns</sup>	
Fc B x F	2,829 <sup>ns</sup>	
Fc B x T	0,268 <sup>ns</sup>	
Fc F x T	2,548*	
Fc B x F x T	1,516 <sup>ns</sup>	
CV %	7,53	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; Fc: valor de F calculado; \*\*, \* e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo pelo teste t, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

De acordo com resultados do teste de sanidade observou-se que houve efeito significativo dos fatores isolados, das interações duplas e da interação tripla entre biopolímero, fungicida e tratamento biológico (Tabela 5). Quando foi avaliada a quantidade de sementes sem ataque de patógenos no desdobramento de biopolímero dentro de fungicida e tratamento biológico observou-se que as sementes tratadas com *P. fluorescens* e *T. harzianum* apresentaram menor incidência de fungos sem o uso de biopolímero. Provavelmente o biopolímero, por ser composto de moléculas orgânicas, pode ter servido como fonte de nutriente para a multiplicação do inóculo de fungos. Já para as sementes sem fungicida não houve diferença significativa entre o uso ou não de biopolímero.

Analisando-se as sementes tratadas com fungicida e biopolímero, observou-se que a testemunha (sem tratamento) e *A. brasilense* tiveram maior porcentagem de sementes sem ataque de fungos, sem diferir do tratamento com *B. subtilis*, e o tratamento biológico *T. harzianum* foi o que apresentou maior ataque de patógenos. Quando foi analisado tratamento fungicida sem o uso de biopolímero, os tratamentos que apresentaram menor ataque de fungos foram testemunha e *T. harzianum*, já o

tratamento com *B. subtilis* foi o que apresentou menor porcentagem de sementes sem ataque. O tratamento com *B. subtilis* não apresenta efeito sobre a sanidade de sementes de milho (Junges et al., 2013).

Nos tratamentos sem fungicida e com biopolímero, o tratamento com maior número de sementes sem patógenos foi *P. fluorescens*, em comparação com o tratamento com *B. subtilis*, no entanto, ambos não diferiram da testemunha. Quando não se utilizou fungicida nem biopolímero, *P. fluorescens* apresentou maior quantidade de sementes sem ataques de patógenos, assim o uso de *P. fluorescens* isolado teve algum efeito no controle de patógenos, já a testemunha, *B. subtilis*, e *T. harzianum* tiveram menor desempenho, devido ao maior controle de patógenos ocorrer na presença de fungicida. Para o desdobramento de fungicida dentro de biopolímero e tratamento biológico, observou-se que ao se utilizar fungicida os tratamentos tiveram maior porcentagem de sementes sem ataque de patógenos do que quando não foi utilizado fungicida. Nos tratamentos sem biopolímero, também se observou o mesmo comportamento.

Comparando-se os tratamentos biológicos, nenhum deles teve eficiência na erradicação de patógenos quando comparados à testemunha (sem tratamento biológico). No entanto, têm-se relatos da eficiência de tratamentos biológicos no controle de patógenos. Resultados encontrados por Kristek et al. (2006) mostraram que sementes inoculadas com *P. fluorescens* combinadas com baixas doses de fungicida em beterraba tiveram baixa porcentagem de plantas infectadas por patógenos. Segundo Silva et al. (2017), *T. harzianum* tem a capacidade de exercer antagonismo a diversos fungos prejudiciais ao desenvolvimento das plantas, isso ocorre devido sua capacidade de parasitismo, antibiose e/ou competição com esses patógenos. Adicionalmente, o biocontrole através competição entre os microrganismos com os patógenos das sementes e solo, poderia ser notado durante maior tempo de desenvolvimento da cultura. O tratamento biológico pode aumentar o crescimento vegetal e a indução da resistência sistêmica (Compant et al., 2005). Além disso, o tratamento biológico pode influenciar na qualidade fisiológica de sementes, através da indução da produção de promotores de crescimento, como faz o *A. brasilense*, fato que poderia ser observado no decorrer do ciclo da cultura. Assim sendo, os efeitos dos tratamentos biológicos seriam observados no maior crescimento vegetal e resistência aos patógenos.

**Tabela 5** – Sementes de milho sem contaminação por fungos (%), avaliadas pelo teste de sanidade – *blotter test*, com microbiolização associada com fungicida e biopolímero

	Tratamento biológico	Biopolímero	
		Com	Sem
Com fungicida	Ausente	84,00 Aa	83,50 Aa
	<i>A. brasilense</i>	79,00 Aa	74,50 ABa
	<i>B. subtilis</i>	70,50 ABa	67,00 Ba
	<i>P. fluorescens</i>	60,00 Bb	72,50 ABa
	<i>T. harzianum</i>	37,00 Cb	88,00 Aa
Sem fungicida	Ausente	14,50 ABa	5,50 Ba
	<i>A. brasilense</i>	6,00 ABa	13,50 ABa
	<i>B. subtilis</i>	0,00 Ba	0,50 Ba
	<i>P. fluorescens</i>	19,00 Aa	23,50 Aa
	<i>T. harzianum</i>	3,00 ABa	2,50 Ba
	Tratamento biológico	Fungicida	
		Com	Sem
Com biopolímero	Ausente	84,00 a	14,50 b
	<i>A. brasilense</i>	79,00 a	6,00 b
	<i>B. subtilis</i>	70,50 a	0,00 b
	<i>P. fluorescens</i>	60,00 a	19,00 b
	<i>T. harzianum</i>	37,00 a	3,00 b
Sem biopolímero	Ausente	83,50 a	5,50 b
	<i>A. brasilense</i>	74,50 a	13,50 b
	<i>B. subtilis</i>	67,00 a	0,50 b
	<i>P. fluorescens</i>	72,50 a	23,50 b
	<i>T. harzianum</i>	88,00 a	2,50 b
Fc Biopolímero (B)		9,959**	
Fc Fungicida (F)		1167,557**	
Fc Trat. biol. (T)		9,256**	
Fc B x F		8,005**	
Fc B x T		8,418**	
Fc F x T		7,345**	
Fc B x F x T		8,910**	
CV %		28,92	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; Fc: valor de F calculado; \*\*, \* e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo pelo teste t, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

## CONCLUSÕES

Os tratamentos biológicos, fungicida e o uso do biopolímero não aumentaram o vigor e a viabilidade avaliada pelo teste de germinação de sementes. O fungicida teve efeito negativo sobre *A. brasilense*, quando se avaliou o vigor e a viabilidade de sementes, e o biopolímero teve efeito protetor sobre este microrganismo. A associação de fungicida com *B. subtilis* aumentou a massa seca de plântula. O tratamento fungicida foi eficiente no controle de fungos, o mesmo não sendo observado para os tratamentos biológicos.

## REFERÊNCIAS

- BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D.de.; CAMARGO, F.A.O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, Brasília, v.37, n.3, p.727-733, 2007.
- BRAND, S.C.; ANTONELLO, L.M.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E.; SANTOS, V.J.; REINIGER, L.R.S. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja submetidas a tratamento com bioprotetor e fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.31, n.4, p.87-94, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009a. 395p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: MAPA-ACS, 2009b. 200p.
- CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Paris, v.45, n.1, p.28-35, 2009.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: oitavo levantamento, maio de 2016. Brasília: CONAB, 2016. 178p. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_06\\_10\\_14\\_42\\_08\\_boletim\\_graos\\_maio\\_2016\\_-\\_final.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_10_14_42_08_boletim_graos_maio_2016_-_final.pdf). Acesso em: 17 nov. 2016.
- COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; BARKA, E.A.; CLÉMENT, C. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Paris, v.71, n.9, p.4951-4959, 2005.
- ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Londres, v.102, p.719–732, 1996.
- EMBRAPA - Agência Embrapa de informação tecnológica. **Rizobactérias**. 2005. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_53\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_53_210200792814.html). Acessado em 05 de março de 2014.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v.6, n.2, p.36-41, 2008.
- HARMAN, C.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma species: Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, Londres, v.2, p.42–58, 2004.

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

HÖFS, A.; SCHUCH, L.O.B.; PESKE, S.T.; BARROS, A.C.S.A. Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta à qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.26, n.1, p.92-97, 2004.

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Nova Iorque, v.92, p.177-180, 2002.

JUNGES, E.; TOEBE, M.; SANTOS, R.F.; FINGER, G.; MUNIZ, M.F.B. Efeito do condicionamento fisiológico e da peliculização associados à *Bacillus subtilis* em sementes de milho. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.44, n.3, p.520-526, 2013.

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

KLOEPPER, J.; SCHROTH, M. Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. **Plant Pathogenic Bacteria**, Nova Iorque, v.2, n.286, p.879-882, 1978.

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

KRISTEK, S.; KRISTEK, A.; GUBERAC, V.; STANISAVLJEVIĆ, A. Effect of bacterium *Pseudomonas fluorescens* and low fungicide dose seed treatments on parasite fungus *Aphanomyces cochlioides* and sugar beet yield and quality. **Plant Soil Environment**, Praha, v.52, n.7, p.314-320, 2006.

LUZ, W.C. da. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. Cap.3, p.25-31. (Embrapa-CNPDA. Documentos, 15).

LUZ, W.C. da. Controle microbiano de *Pyricularia oryzae* em sementes de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.2, p.134, 1990.

LUZ, W.C. da. Microbiolização das sementes: uma comparação com o tratamento químico no controle dos principais patógenos das sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Passo Fundo, v.33, n. especial, p.509-513, 1998.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2.ed. Londrina: ABRATES, 2015. 660p.

MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1995.



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

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap. 2, p. 2-24.

PEREIRA, G.V.N. **Promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro inoculadas com *Trichoderma* spp.** 2012. 67p. Tese (Pós-Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, n.3, p.1139-1146, 2008.

SALUM, J.D.; ZUCARELI, C.; GAZOLA, E.; NAKAGAWA, J. Características químicas e fisiológicas de sementes de feijão em função do teor de fósforo na semente e doses de fósforo no solo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.30, n.1, p.140-149, 2008.

SILVA, F.F.; CASTRO, E.M.; MOREIRA, S.I.; FERREIRA, T.C.; LIMA, A.E.; ALVES, E. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.43, n.1, p.41-45, 2017.