

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

CAROLINA OLIVEIRA DA SILVA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE MILHO (*Zea
mays* L.) TRATADAS COM AGENTES DE BIOCONTROLE**

Uberlândia – MG
Outubro 2012

CAROLINA OLIVEIRA DA SILVA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays*
L.) TRATADAS COM AGENTES DE BIOCONTROLE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi

Uberlândia – MG
Outubro 2012

CAROLINA OLIVEIRA DA SILVA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays*
L.) TRATADAS COM AGENTES DE BIOCONTROLE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 05 de Outubro de 2012.

Adílio de Sá Junior

Membro da banca

Prof. Dr. Jonas Jager Fernandes

Membro da banca

Profa. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi

Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais. Pois são bem mais que um exemplo de vida, são o meu porto seguro, a minha estrutura, e sou eternamente grata à Deus por ter pessoas maravilhosas como vocês em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por minha vida, por me proteger e me amparar sempre, pelas bênçãos e graças concedidas à cada novo dia de vida.

Aos meus pais e irmãs meus sinceros agradecimentos. O amor que nos une a cada dia me dá forças para viver, para vencer e superar cada obstáculo que surge , pois onde quer que eu vá, sei que jamais estarei sozinha, e sei que em qualquer situação nós seguiremos sempre juntos, acolhendo uns aos outros. Deus foi muito generoso ao me presentear com pessoas tão especiais como vocês. A cada conquista ou derrota, a certeza de tê-los ao meu lado é o que me sustenta, para recomeçar sem pensar em desistir, pois é para vocês e por vocês que busco todos os dias de minha vida ser uma pessoa melhor.

À Professora Nilvanira Donizete Tebaldi.

À todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A cultura do milho é uma das maiores commodities na agricultura internacional e uma fonte importante de nutrientes para homens e animais, em que, o uso de sementes de alta qualidade sanitária e fisiológica é de grande importância na implantação da lavoura. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho (*Zea mays* L.) sob diferentes tratamentos. Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Sementes (LASEM) e Virologia Vegetal (LAVIV) do Instituto de Ciências Agrárias na Universidade Federal de Uberlândia. As sementes de milho, PZ 677 e PZ 242 foram tratadas com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e fungicida Derosal Plus (Thiran + Carbendazim) e a testemunha. O teste padrão de germinação de sementes, foi constituído por 4 repetições de 50 sementes em delineamento experimental de blocos casualizados, sendo utilizado papel germiteste umedecidos com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, posteriormente acondicionados em um germinador com temperatura alternando de 20 a 25 C°. Para o índice de velocidade de emergência (IVE) das plântulas, cada parcela experimental foi composta por 4 repetições com 50 sementes com delineamento experimental de blocos casualizados, as mesmas foram colocadas em bandejas plástica contendo como substrato areia sendo a temperatura e umidade vistoriadas através do auxílio de termômetro e medidor de umidade, e avaliado o IVE e a porcentagem de emergência. O teste de sanidade de sementes, foi constituído por 8 repetições de 25 sementes com delineamento experimental inteiramente casualizados, as sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada em caixas plásticas tipo *gerbox* então incubadas a temperatura de 20°C em uma BOD, por 24 horas e no freezer por mais 24 horas, em seguida transferidas novamente para BOD, permanecendo incubadas por um período de 5 dias. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Conclui-se que os tratamentos não influenciaram na germinação (variando de 85 a 95%) e no índice de velocidade de emergência (variando de 5 a 9) e que as sementes tratadas com fungicida (Thiram + Carbendazim) houve o controle dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* sp. e as sementes tratadas com *Trichoderma asperellum* houve o controle apenas de *Penicillium* sp.

Palavras-chaves: *Bacillus subtilis*, *Trichoderma*, fungicida.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DE LITERATURA	Erro! Indicador não definido.
2.1	<i>Trichoderma</i> sp.	Erro! Indicador não definido.
2.2	<i>Bacillus</i> sp.	Erro! Indicador não definido.
2.3	Fungicidas	Erro! Indicador não definido.
2.4	Teste padrão de germinação	Erro! Indicador não definido.
2.5	Teste de vigor	Erro! Indicador não definido.
2.6	Sanidade de sementes	Erro! Indicador não definido.
3	MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1	Teste padrão de germinação	Erro! Indicador não definido.
3.2	Índice de velocidade de emergência	Erro! Indicador não definido.
3.3	Sanidade de sementes	Erro! Indicador não definido.
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
5	CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador não definido.
	REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.
	ANEXOS.....	30

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) originado do México apresenta grande diversidade genética que é mantido em bancos de germoplasma. A partir da segunda metade do século XX, o desenvolvimento de híbridos aumentou a produtividade e a qualidade do milho.

É uma planta herbácea, monóica, isto é, possui os dois sexos na mesma planta em inflorescências diferentes, e anual, completando seu ciclo em quatro a cinco meses (CAMPOS; CANÉCHI FILHO, 1973).

A cultura do milho é uma das maiores commodittes na agricultura internacional e uma fonte importante de nutrientes para homens e animais. No Brasil, nas safras 2010/2011 foram produzidos 51 milhões de toneladas, colocando o país como o terceiro maior produtor mundial, após os Estados Unidos e a China (USDA, 2012).

Além da sua importância econômica como principal componente na alimentação de aves, suínos e bovinos, o milho cumpre papel técnico importante para a viabilidade de outras culturas, como a soja e o algodão, por meio da rotação de culturas, minimizando possíveis problemas como nematóides de galha, nematóide de cisto e doenças como o mofo branco e outras, dando sustentabilidade para diferentes sistemas de produção em muitas regiões agrícolas do Brasil e do mundo (CIB, 2009).

O rendimento do milho pode ser influenciado por fatores como a disponibilidade hídrica, fertilidade do solo, população de plantas, sistema de cultivo, potencial produtivo do híbrido e manejo de plantas daninhas, pragas e doenças (SANDINI; FANCELLI, 2000; FANCELLI; DOURADO-NETO, 2003).

Um dos maiores problemas da cultura do milho é a presença de patógenos que causam perdas significativas na produção, e o emprego da técnica de tratamento de sementes traz grandes benefícios à cultura.

Dentre os fungos patogênicos transmitidos pelas sementes de milho, destacam-se *Fusarium verticillioides* (sin. *F. moniliforme* (Sacc.) Nirenberg), *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. O fungo *F. verticillioides* também está associado ao apodrecimento de sementes de milho e à morte de plântulas em pré ou pós-emergência (TRENTO et al., 2002), sendo o principal patógeno associado as sementes (REIS; CASA, 1996), seguido por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., que são encontrados com maior frequência em sementes armazenadas (CASA et al., 2006).

O tratamento de sementes é usado principalmente com a finalidade de permitir a germinação de sementes infectadas, controlar patógenos transmitidos pela semente e proteger as sementes dos fungos do solo (HENNING et al., 1991). Além de conferir proteção às sementes, o tratamento das mesmas oferece garantia adicional ao estabelecimento da lavoura a custos reduzidos, representando menos de 0,5% do custo de instalação da lavoura (HENNING, 2005).

Alguns fungos patogênicos transmitidos pelas sementes são economicamente importantes, pois constituem fontes de inóculo para o desenvolvimento de doenças e podem interferir na emergência e estabelecimento das culturas. A prática recomendada para o controle desses patógenos é a aplicação de fungicidas sintéticos no tratamento de sementes, que se tornou indispensável para garantir a sanidade das mesmas. Porém, estudos recentes alertam para o uso excessivo de fungicidas, que podem ocasionar efeitos adversos na saúde humana e na diversidade de microorganismos. Assim, a conscientização ecológica globalizada exige alimentos mais naturais, o que tem levado ao aprimoramento de medidas de controle integrado, através do uso de métodos alternativos para a produção de sementes livres de resíduos tóxicos (SOUZA et al., 2003).

O avanço da tecnologia no tratamento de sementes, além de agroquímicos, o uso de bioprotetores têm crescido na agricultura nacional. Dentre os bioprotetores destaca-se *Trichoderma* sp., *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp, que surgiram no intuito de reduzir a utilização de pesticidas sintéticos, os riscos aos operadores e os possíveis prejuízos ao meio ambiente (MERTZ et al., 2008).

Muitos microrganismos, além de atuarem no controle de patógenos de plantas, também promovem o seu crescimento. Eles têm a capacidade de controlar os patógenos das sementes, os quais sobrevivem no solo causando podridão, morte das plântulas e tombamento; proteger as partes subterrâneas das plantas contra patógenos; melhorar a taxa de germinação e o vigor das sementes; fixar o N₂; melhorar a absorção de nutrientes; promover o crescimento e aumentar o rendimento das plantas (MENEZES, 1992; HARMAN, 2000).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho (*Zea mays* L.) tratadas com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e fungicida Derosal Plus (thiran + carbendazin).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A cultura do milho tem evidenciado avanços significativos nas mais diversas áreas do conhecimento agrônomo, bem como naquelas concernentes à ecologia e etnobiologia, propiciando melhor compreensão de suas relações com o ambiente e o homem. Tais interações mostram-se fundamentais para o exercício da previsão de comportamento da planta, quando submetida a estímulos e ações negativas advindas da atuação de agentes bióticos e abióticos no sistema produtivo (PATERNIANI et al., 1995).

O uso de sementes de alta qualidade sanitária e fisiológica é de grande importância na implantação da lavoura, sendo que a sanidade da semente refere-se, à presença ou ausência de agentes patogênicos, tais como fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos e a fisiológica à capacidade de emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 2009).

Diversas doenças, muitas das quais transmitidas pelas sementes, têm sido apontadas como redutoras da produtividade na cultura do milho (LUCCA FILHO, 1984), dentre os fungos frequentemente encontrados nas sementes, os mais importantes em termos de qualidade para semeadura são *Fusarium* sp., *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., uma vez que podem contribuir para a redução do poder germinativo. Sendo que em culturas de alta rentabilidade como a do milho, os fungicidas propiciam a obtenção de fibras e alimentos necessários à população, mas mesmo para essas culturas o controle biológico de fitopatógenos apresenta uma série de vantagens em relação ao uso de fungicidas. Desta forma, a estratégia de controle biológico clássico, por exemplo, enquanto os fungicidas possuem um efeito temporário e necessitam de repetidas aplicações durante o ciclo das culturas, os agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema (ÁVILA et al., 2005). Entretanto, o aspecto mais importante a ser considerado, qualquer que seja a estratégia utilizada, é que esses agentes biológicos constituem alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao meio ambiente (MELLO et al., 2007).

Os mecanismos básicos de antagonismo dos bioprotetores são: antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de resistência. Na prática, provavelmente poucos organismos exerçam um único mecanismo antagônico. Um antagonista pode atuar através de um ou mais mecanismos, o que constitui uma característica muito desejável, pois

as chances de sucesso do controle biológico serão aumentadas. O conhecimento dos mecanismos de antagonismo é essencial no desenvolvimento de modelos racionais para a introdução de biocontroladores em agroecossistemas (OLIVEIRA, 2007).

2.1 *Trichoderma* sp.

O agente de controle biológico, *Trichoderma* é um fungo hiperparasita que tem a fase sexuada no filo *Ascomycota*, classe *Euasmycetes*, ordem *Hypocreales*, família *Hypocreaceae*, Género *Hypocrea* (MONTE, 2001), sendo as espécies *T. harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* as mais utilizadas como agentes de biocontrole de fitopatogênicos (HERMOSA et al., 2000). O rápido crescimento desse fungo em culturas, a produção de um micélio aéreo esparso, com o tipo de ramificação dos conidióforos e o modo de disposição das fiálides são características utilizadas para distinguir as espécies desses gêneros (RESENDE et al., 2004).

Ocorrem naturalmente nos solos e são considerados antagonistas eficientes contra fitopatógenos de importância econômica, e como promotor de crescimento de plantas (RESENDE et al., 2004). Além disso, participam da decomposição da matéria orgânica e são citados como atuantes na degradação de resíduos tóxicos em solos e potencialização da germinação. Quando utilizados no tratamento de sementes colonizam o local onde estas são depositadas, podendo reduzir os problemas de tombamento e baixo “stand” de plantas no campo.

O biocontrole ocorre de maneira indireta, por competição de nutrientes e espaço; estimulação do crescimento das plantas; mecanismos de defesa; produção de antibióticos ou ainda, diretamente por micoparasitismo. Esses mecanismos podem ainda atuar de forma sinérgica e a sua importância nos processos de biocontrole dependem, não só da espécie, mas do isolamento de *Trichoderma*; do fungo que antagoniza; do tipo de cultura; das condições ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e umidade (BENÍTZ et al., 2004).

De acordo com Resende et al. (2004) a inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento, resultou em plantas com maior acúmulo de matéria seca nas raízes.

Em solos naturais, foi observado que isolados de *Trichoderma* spp. proporcionaram maior germinação de sementes, emergência e vigor de plântulas de berinjela (MARTINS CORDER; MELO, 1997).

A ação positiva de isolado de *T. harzianum* em tratamento de semente e de solo, na germinação de feijão foi de 77 e 100%, rabanete 58 e 100%, tomate 100 e 70%, pimenta 90%, pepineiro 90 e 100%, respectivamente, evidencia que as variações nos resultados, nesse experimento, foram decorrentes da forma de tratamento e da cultura (KLEIFELD; CHET, 1992). Já Ousley et al. (1993) observaram que alguns isolados de *Trichoderma harzianum* auxiliaram e outros inibiram a germinação de sementes de alface.

Menezes (1992) avaliando o efeito antagônico via tratamento de sementes de feijão e de soja com espécies de *Trichoderma* no controle de *Macrophomina phaseolina*, verificou que os antagonistas promoveram melhor germinação, crescimento e desenvolvimento das plantas de feijão, e maior índice de velocidade de germinação em plantas de soja.

O estabelecimento de *Trichoderma viride* no solo favoreceu o cultivo de maçãs, sendo observado que a mistura de *T. viride* com solo parcialmente esterilizado foi capaz de proteger mudas de macieira, por muitos anos, contra podridões causadas por *Phytophthora* sp. e *Rosellinia* sp. (SANHUEZA, 2001). A aplicação de *T. harzianum* (T-22) no solo, protegeu pessegueiros contra *Armillaria mellea* por pelo menos quatro anos; e ainda, a aplicação de T-22 no solo, antes do plantio de mudas de morango, protegeu a cultura mesmo em solos infestados com *Verticillium* sp. e *Phytophthora* sp. (HARMAN, 2000).

Lima et al. (2007) constataram que a imersão de bulbilhos de alho em suspensão de esporos de *Trichoderma asperellum* pode ser usado isolado ou associado a fungicidas melhorando o stand de plantas.

2.2 *Bacillus* sp.

Várias espécies de *Bacillus* são antagonistas de fungos fitopatogênicos podendo ser usadas em programas de controle biológico (ANGONESE et al., 2009; SCHISLER et al., 2004; WULFF et al., 2002; WILHELM et al., 1998).

Parte dos microrganismos envolvidos em controle biológico atua através de antibiose. Diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de anitibióticos podendo secretar metabólitos comercialmente importantes como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (BETTIOL; GHINI, 1995).

O *Bacillus subtilis* é uma das principais rizobactérias de importância para o aumento do crescimento vegetal. Esta rizobactéria influencia positivamente a germinação, desenvolvimento e rendimento da cultura, devido à produção de substâncias promotoras de

crescimento e a melhoria na nutrição das plantas, principalmente pela solubilização de fósforo (LUZ, 2001).

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias em forma de bastonetes, Gram positivas, móveis (LIMA, 2010). Bacon et al. (2001) consideram *Bacillus subtilis* um grupo de bactérias não patogênicas com alto potencial para uso industrial, por ser de fácil cultivo e multiplicação, além de formar endospóros que são uma vantagem para a maioria das aplicações industriais e usos biotecnológicos. Esses autores relatam, ainda, a redução nos níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *Fusarium moniliforme* em função da ação biológica do *B. subtilis*.

Isolados de *Bacillus* spp. inibiram o crescimento de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos (*Citrus* spp.), tanto sob condições de laboratório como nas condições de campo (KUPPER et al., 2003).

Em batata-doce (*Beta vulgaris* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.), a aplicação de *B. subtilis* reduziu a incidência de *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. e outros patógenos, além de estimular a germinação, o crescimento e a produtividade das plantas (BALDOTTO et al., 2010; RAUPACH; KLOEPPER, 1998). *B. subtilis* apresenta atividade *in vitro* contra diferentes tipos de patógenos para várias espécies cultivadas, por meio da produção de antibióticos como iturina A e surfactina, capazes de inibir o crescimento micelial de fungos (ASAKA; SHODA, 1996). Do mesmo modo, *Bacillus cereus* isolado excreta quitinase e sua aplicação no solo protegeu de forma significativa plântulas de algodão contra doenças causadas por *Rhizoctonia solani* (PLEBAN et al., 1997).

Bettiol (1988) em trabalho de seleção de microrganismo antagonico a *Pyricularia oryzae*, verificou que *B. subtilis* foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno, e constatando também que o antagonista apresenta boas características para uso como agente de controle biológico, pois, além de rápido desenvolvimento, tanto em meio de cultura como na natureza, produzem endósporo e antibióticos, crescem em larga faixa de temperatura e adaptam-se a várias condições ambientais.

2.3 Fungicidas

A necessidade do uso de fungicidas protetores em sementes de milho é de suma importância, em especial quando essas se destinam a plantios em solos com temperaturas amenas e em condições que retardam a germinação das sementes (PEREIRA, 1986), em que a baixa população de plantas por área é uma das maiores causas da baixa produtividade de

milho, e qualquer prática que contribua para o estabelecimento de um bom "stand", como o tratamento de sementes com fungicidas será de grande valor.

O tratamento de sementes de milho com fungicidas é uma prática usada para protegê-las contra as podridões de sementes, morte e tombamento de plantas induzidos por fungos na semente ou no solo (LUZ, 1997), contribuindo para a manutenção do stand, além de reduzir a disseminação de vários patógenos. Falhas na emergência refletem-se diretamente na densidade final de plantas e conseqüentemente na produtividade, pelo fato do milho ter uma baixa capacidade de compensação efetiva entre plantas (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). O objetivo principal desse tipo de prática é erradicar ou reduzir, aos mais baixos níveis possíveis, os fungos presentes nas sementes, além de protegê-las dos patógenos do solo e da própria semente, quando as condições de semeadura são desfavoráveis. Conseqüentemente, populações adequadas de plantas serão obtidas com a adoção dessa prática. Um aspecto importante e que deve ser considerado é que o tratamento não visa o aumento da viabilidade da semente. Se a baixa germinação for causada por fatores como dano mecânico, deterioração por umidade ataque de percevejos e armazenagem inadequada, os fungicidas não demonstrarão qualquer efeito. Por outro lado, se a baixa qualidade da semente for causada por fungos, o tratamento proporcionará incrementos dessas características.

2.4 Teste padrão de germinação

Os resultados do teste de germinação são utilizados para comparar a qualidade fisiológica de lotes, determinar a taxa de semeadura e servir como parâmetro de comercialização de sementes. Para fins comerciais, a adoção de um procedimento padrão na instalação, condução e avaliação dos testes, permite a obtenção de resultados comparáveis entre laboratórios de empresas fornecedoras e compradoras de sementes (MARCOS FILHO et al., 1987; ISTA, 2004).

O substrato utilizado para a germinação deve, durante todo o período do teste, manter umidade suficiente para garantir que o processo de germinação ocorra de forma plena, pois a deficiência de água impossibilita a seqüência dos processos bioquímicos, físicos e fisiológicos, que determina a retomada do crescimento do embrião. Entretanto, a umidade não pode ser excessiva, pois pode limitar a aeração e prejudicar a germinação (ISTA, 2004).

Assim, o teste é realizado seguindo-se uma metodologia padronizada, sob condições artificiais controladas de laboratório, altamente favoráveis, para que se obtenha a maior porcentagem de germinação no menor tempo possível.

2.5 Teste de vigor

A Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes (ABRATES, 1994) preconiza que os testes de vigor são utilizados com várias finalidades, mas a razão fundamental é a determinação do potencial fisiológico de um lote de sementes, fornecendo informações complementares ao teste de germinação. Os diferentes métodos como, primeira contagem, emergência de plântulas em campo envelhecimento aceleradas não foram desenvolvidos para prever o número exato de sementes que germinará em campo sob variadas condições de ambiente, mais sim, o potencial (qualidade) da semente em germinar em condições favoráveis ou não de ambiente. Os testes de vigor se mostram então, muito úteis nas etapas de um programa de produção de sementes como avaliação do potencial fisiológicos de lotes com germinação semelhante, seleção de lotes para a semeadura, com base no potencial de emergência das plântulas em campo, avaliação do potencial de armazenamento, avaliação do grau de deterioração, controle de qualidade pós-maturidade, avaliação da qualidade fisiológica e auxílio em métodos de seleção durante o melhoramento de plantas e avaliação de efeitos de injúrias mecânica e térmica, tratamento fungicida e de outros fatores adversos pré e pós- colheita (PANOBIANCO; MARCOS FILHO, 1998).

Apesar de diversos estudos que buscam a padronização dos testes de vigor, são encontradas certas dificuldades em função de que o vigor pode ser refletido através de várias características como velocidade de germinação, uniformidade de emergência, resistência ao frio, temperatura e umidade elevadas, substâncias tóxicas entre outros (CARVALHO; VANZOLINI, 2004). Diante disto, deve-se ressaltar a importância da realização de um conjunto de testes que responda a estas características. O uso de testes de vigor é de grande utilidade no monitoramento da qualidade das sementes, a partir da maturidade, pois a queda do vigor precede a perda de viabilidade (DIAS; MARCOS FILHO, 1995).

2.6 Sanidade de sementes

As sementes de milho infectadas por fungos constituem-se em importantes fontes de inóculo, cujos patógenos podem causar podridões de sementes, morte de plântulas em pré e pós-emergência e podridões radiculares, o que leva a formação de lavouras com baixa população de plantas (PINTO, 2004). Desta forma é de grande importância a realização de testes para detecção de fungos em sementes.

Dentre as metodologias de testes de sanidade para a detecção de fungos em sementes, o teste com incubação sob condições controladas tem o objetivo de facilitar o crescimento e esporulação dos fungos e a indução de sintomas, o que permite uma identificação rápida e segura do microorganismo envolvido. Os métodos desenvolvidos nos últimos anos incluem técnicas que variam em grau de complexidade. Dentre os métodos considerados simples cita-se o do substrato de papel com suas variações na metodologia. Este método é de uso rotineiro em laboratórios de análise por preencher os requisitos de rapidez, simplicidade, baixo custo e permitir o levantamento da microflora associada à diversos tipos de sementes, quantificação do inóculo e avaliação preliminar da germinação (LUCCA FILHO, 1987; TANAKA, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Virologia Vegetal e Fitopatologia (LAVIV), Análise de Sementes (LASEM) e em Casa de Vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias na Universidade Federal de Uberlândia, nos meses de junho e julho de 2011.

Foram utilizadas sementes dos híbridos PZ 677 e PZ 242, sem tratamentos, ambos de peneira 22L, safra 2010/2011, cedidas pela empresa Primaiz Sementes em novembro de 2010, permanecendo armazenadas na câmara fria por um período de 7 meses, sendo fracionadas em quatro porções iguais de 300 gramas, tratadas com: *Tricoderma asperellum* (6 mL/ 1 Kg de sementes, contendo $1,0 \times 10^{10}$ UFC x g^{-1}) da Sementes Farroupilha, *Bacillus subtilis* (6 mL/ 1 Kg de sementes, contendo 10^8 UFC x mL^{-1}), fungicida Derosal Plus (Thiran+Carbendazim, 2 mL/ 1Kg de sementes diluído em 1 mL de água) e a testemunha.

Os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial 2X4, sendo o primeiro fator híbridos de milho e o segundo agentes de biocontrole, tratamento químico e a testemunha.

O tratamento de sementes foi realizado manualmente utilizando um saco plástico simples e como veículo para mistura, água. Posteriormente submeteu-se o recipiente a uma agitação repetitiva, de um lado para o outro, até que se obteve uma boa uniformidade de espalhamento dos produtos, por todas as sementes encontradas no recipiente.

3.1 Teste padrão de germinação

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) na Universidade Federal de Uberlândia. O delineamento experimental foi de blocos casualizados contendo 4 blocos, com quatro repetições de 50 sementes. O teste padrão de germinação foi realizado de acordo com as regras de análise de sementes (BRASIL, 2009).

As sementes foram colocadas entre duas folhas de papel germiteste umedecidos com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Após montado o teste o mesmo foi acondicionado em um germinador Biomatic, modelo Mangelsdorf a uma temperatura alternada de 20-25 C° de 12 em 12 horas, com alternância de luz. A primeira leitura (vigor) foi realizada quatro dias após a montagem do experimento, onde foram observadas as sementes germinadas. A segunda leitura após sete dias, onde foi avaliada a

porcentagem de plântulas normais, de acordo com as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para análise das pressuposições foi usado o programa SPSS (PEREIRA, 2006) que determina a homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos e as médias comparadas pelos testes de Levene, Shapiro-Wilk. Para a análise estatística foi utilizado o programa SISVAR e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Índice de velocidade de emergência

O ensaio foi conduzido na Casa de Vegetação do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), na Universidade Federal de Uberlândia. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, em esquema fatorial 2x4, sendo os fatores: híbridos de milho descritos anteriormente e as sementes tratadas com dois agentes de controle biológico, o tratamento químico e a testemunha, totalizando 8 tratamentos, com 4 repetições de 50 sementes. Cada parcela experimental foi constituída de uma bandeja plástica (54 x 33 x 9 cm) contendo como substrato areia peneirada de textura média. O umedecimento do substrato foi efetuado com quantidade de água correspondente a 60% da capacidade de retenção. A temperatura e umidade foram vistoriadas diariamente através do auxílio de um termômetro e um medidor de umidade. A contagem foi iniciada no momento em que a primeira plântula emergiu e foi finalizada quando o número de plântulas permaneceu estável. Em seguida, foi calculado o índice de velocidade de emergência pela fórmula (MAGUIRE, 1962):

$$IVE = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$$

Onde:

G_1, G_2, G_n = número de plântulas na primeira contagem, segunda e última contagem.

N_1, N_2, N_n = números de dias a primeira, segunda e última contagem.

Para análise estatística as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Sanidade de sementes

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Virologia Vegetal e Fitopatologia (LAVIV). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com os tratamentos descritos anteriormente, com oito repetições de 25 sementes. As sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada em caixas plásticas tipo *gerbox*.

Em seguida as caixas foram incubadas a temperatura de 20°C em uma BOD, por um período de 24 horas e depois transferidas para um freezer, por 24 horas, para inibir a germinação das sementes, então transferidas novamente para BOD, permanecendo incubadas por um período de 5 dias (12 horas luz/ 12 horas escuro).

Para identificação dos fungos, prescritos pelas Regras de Análise de Sementes, (Brasil, 2009) *Acremonium strictum*, *Colletotrichum graminicola*, *Drechslera turcica*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sub-glutinans*, *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella macrospora*, *Stenocarpella maydis*, *Aspergillus* spp. foi realizado com auxílio de lupa modelo XTL6445T – B2 e microscópio ótico e esferoscópio modelo L 2000 C para identificação, avaliando a incidência dos fungos nas sementes em porcentagem e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico SISVAR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi necessário a transformação dos dados de germinação para análise das pressuposições, pois houve homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos.

Para a primeira contagem do teste padrão de germinação (vigor), porcentagem de germinação de sementes milho (Tabela 1), não houve diferença significativa entre os diferentes agentes de controle, químico, biológico, testemunha e híbridos utilizados. Sendo que, na primeira contagem do teste padrão de germinação os valores variaram de 16 a 31%. Já para o teste padrão de germinação os valores variaram de 85 a 93% entre os tratamentos.

Os resultados observados podem ter sofrido interferência devido ao período de armazenamento em câmara fria das sementes por um período de 6 meses, alterando assim a qualidade fisiológica das sementes.

Tabela 1. Vigor (primeira leitura) e porcentagem de germinação de plântulas normais em sementes de milho híbrido tratadas com agentes de biocontrole e produto químico. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

Variável (%)	Tratamentos	Híbridos		Médias
		PZ 242	PZ 677	
Vigor (1º contagem)	Testemunha	23,00	31,00	27,00 a
	<i>Trichoderma asperellum</i>	24,00	27,00	25,25 a
	<i>Bacillus subtilis</i>	17,00	16,00	16,50 a
	Fungicida (Thiram+Carbendazin)	21,00	31,00	26,00 a
	Médias	21,25 A	26,12 A	
		F híbrido = 1,932 F tratamento = 1,788 CV(%) = 44,26		
Germinação	Testemunha	85,00	91,00	88,00 a
	<i>Trichoderma asperellum</i>	91,00	86,00	88,50 a
	<i>Bacillus subtilis</i>	83,00	89,00	86,00 a
	Fungicida (Thiram+Carbendazin)	93,00	92,00	92,50 a
	Médias	88,00 A	89,50 A	
		F híbrido = 0,552 F tratamento = 1,749 CV(%) = 6,44		

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúscula na linha, diferem pelo teste Tukey a 0,05 de significância.

Sementes de algodão submetidas aos tratamentos com *T. harzianum*, Carboxin+Thiram e Carbendazin+Thiram apresentaram porcentagem de germinação estatisticamente superior à testemunha (FARIA et al., 2002, apud, MERTZ et al., 2008).

Lazzaretti e Bettiol (1997) observaram que a utilização de sementes microbiolizadas com *Bacillus subtilis*, tiveram efeito positivo na germinação assim como Martins-Corder e Melo (1997), que demonstraram o potencial de agentes de controle biológico como *Trichoderma* spp. na elevação da germinação de sementes, emergência e vigor de plântulas de berinjela.

Para o índice de velocidade de emergência (Tabela 2), não houve diferença significativa entre os híbridos testados, a testemunha e as sementes tratadas com *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* e o fungicida (Thiram+Carbendazim), onde o índice de velocidade de emergência apresentou uma variação de 5 a 9, assim como a porcentagem de emergência que variou de 30 a 43 % e não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

Porém, Luz (2001) testando o efeito de bioprotetores em sementes de milho, observou aumento significativo na emergência de plântulas de milho tratadas com *T. harzianum*, demonstrando que o tratamento biológico pode proporcionar melhor emergência de plântulas.

Yedidia et al. (2001), em experimentos realizados também em casa-de-vegetação verificaram um aumento no vigor e desenvolvimento de plantas de pepino tratadas com *T. harzianum*. Lazzaretti e Bettiol (1997) avaliando o tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com formulado de *B. subtilis*, encontraram respostas de aumento de emergência apenas no arroz, esses resultados indicam que existe interação específica entre as estirpes de *B. subtilis* e as cultivares avaliadas.

O uso na agricultura de agentes de biocontrole de fitopatógenos pode ser afetado por vários fatores, como idade, concentração do inóculo, tipo de solo, pH, temperatura, umidade, etc, conforme citado por Kommedahl et al. (1981), Hadar et al. (1984) e Harman (2000).

No presente trabalho, o efeito não significativo entre os diferentes tratamentos provavelmente esteja relacionado com tipo de substrato arenoso, bem como a temperatura da casa de vegetação que alternou entre 36 °C a 40 °C. Isso pode ter promovido um dessecação mais rápido do substrato, mesmo com irrigações frequentes.

Tabela 2. Índice de velocidade de emergência e porcentagem de emergência de plântulas de milho tratadas com agentes de biocontrole e produto químico, em casa-de-vegetação. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

Variável	Tratamentos	Híbridos		Médias
		PZ 242	PZ 677	
IVE	Testemunha	6,00	7,00	6,50 a
	<i>Trichoderma asperellum</i>	7,00	5,00	6,00 a
	<i>Bacillus subtilis</i>	5,00	9,00	7,00 a
	Fungicida (Thiram+Carbendazin)	8,00	8,00	8,00 a
	Médias	21,25 A	26,12 A	
F híbrido = 0,843				
F tratamento = 1,329				
CV(%) = 37,83				
Emergência (%)	Testemunha	30,00	38,00	34,00 a
	<i>Trichoderma asperellum</i>	39,00	34,00	36,00 a
	<i>Bacillus subtilis</i>	32,00	43,00	37,00 a
	Fungicida (Thiram+Carbendazin)	43,00	41,00	42,00 a
	Médias	35,6875 A	38,8750 A	
F híbrido = 0,976				
F tratamento = 1,077				
CV(%) = 24,47				

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem pelo teste de Tukey a 0.05 de significância.

Para a qualidade sanitária de sementes de milho (Tabelas 3 e 4), as mesmas apresentaram 100% infestadas pelos fungos *Fusarium verticilioides* e *Penicillium* sp. em ambos os híbridos.

Houve também infestação das sementes do híbrido PZ 242 pelos fungos: *Aspergillus* (1%) e *Rhizopus* (5,5 %), na testemunha e nas sementes tratadas com *Bacillus subtilis* houve 12,5% de infestação pelo *Rhizopus*. No híbrido PZ 677 pelos fungos: *Acremonium strictum* (1%), *Aspergillus* e *Cladosporium* (0,5%) nas testemunhas, nas sementes tratadas com *Bacillus subtilis* e na testemunha, houve infestação de *Rhizopus* (21%) e (5%), respectivamente. As sementes de milho tratadas com o fungicida (Thiram+Carbendazin) houve ausência dos fungos citados anteriormente.

O fungicida foi eficiente para o controle do fungo *Fusarium verticilioides* (Tabela 3) e os tratamentos com *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* não diferiram estatisticamente, sendo que a testemunha apresentou infestação de 100 %. Desta forma, o tratamento das sementes com *T. asperellum* e *B. subtilis* não foram eficientes para o controle de *Fusarium verticilioides*, com infestação variando de 90 a 100%.

Tabela 3. Porcentagem da incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho tratadas com agentes de biocontrole e produto químico. LAVIV, Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

Tratamentos	Híbridos		Médias
	PZ 242	PZ 677	
Testemunha	100,00	100,00	100,00 c
<i>Trichoderma asperellum</i>	96,00	100,00	98,00 bc
<i>Bacillus subtilis</i>	96,00	84,00	90,00 b
Fungicida (Thiram+Carbendazin)	0,00	0,00	0,00 a
Médias	73,00 A	71,00 A	

F híbrido = 0,692
 F tratamento = 454,963
 CV(%) = 12,56

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem pelo teste Tukey a 0,05 de significância.

As sementes de milho quando tratadas com fungicida, apresentaram 0% de infestação por *Penicillium spp.*, ou seja, 100% de controle (Tabela 4), e quando tratadas com *T. asperellum* de 6 a 18%, enquanto que, as testemunhas apresentaram 100% de infestação, não apresentando diferença significativa das sementes tratadas com *Bacillus subtilis* (97 a 90%) de infestação.

As testemunhas mesmo apresentando alta infestação dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Penicillium sp.* obtiveram uma germinação de 85 a 91%. Porém as sementes do híbrido PZ 242 tratadas com *T. asperellum* obteve um aumento na germinação de 5% mostrando que o tratamento de sementes é de grande importância para produção.

A bactéria endofítica *Bacillus subtilis* foi capaz de reduzir os níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *Fusarium* (BACON et al., 2001) e Harman (2000) relatou que a propagação de crescimento pelo *Trichoderma* depende da concentração, idade do inóculo e vigor das sementes, e que em ótimas condições fisiológicas e edáficas ele proporciona pouca ou nenhum efeito benéfico. Estudos realizados por Angonese et al. (2009), Asaka e Shoda (1996) e Kupper et al. (2003) demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* possuem grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos.

Tabela 4. Porcentagem da incidência de *Penicillium* spp. em sementes de milho tratadas com agentes de biocontrole e produto químico. LAVIV, Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

Tratamentos	Híbridos		Médias
	PZ 242	PZ 677	
Testemunha	100,00 a B	100,00 a C	100,00
<i>Trichoderma asperellum</i>	6,00 a A	18,00 b B	12,00
<i>Bacillus subtilis</i>	97,00 a B	90,00 a C	93,50
Fungicida (Thiram+Carbendazin)	0,00 a A	0,00 a A	0,00
Médias	50,75	52,00	
F híbrido = 0,38			
F tratamento = 618,12			
CV(%) = 16,48			

Médias seguidas por letras distintas minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

5 CONCLUSÕES

Os tratamentos com *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* e fungicida Derosal (Thiram + Carbendazim) não influenciaram na germinação de sementes e no índice velocidade de emergência das plântulas de milho.

O tratamento de sementes com fungicida (Thiram + Carbendazim) controlaram os fungos *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* sp. e as sementes tratadas com *Trichoderma harzianum* houve o controle apenas de *Penicillium* spp.

REFERÊNCIAS

- ANGONESE, M. T.; DELLA-GIUSTINA, J.; PAIM, L. H.; PANSERA, M. R.; PAGNO, R. S.; MEZZOMO, F.; ZORZI, E.; PEREIRA, C. O. F.; RIBEIRO, R. T. S. Fungistatic effect of *Bacillus* spp. on plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Caxias do Sul, v. 4, n. 2, p. 97-100, 2009.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, p. 4081-4085, 1996.
- ÁVILA, Z.R.; CARVALHO, S.S.; BRAÚNA, L.M.; GOMES, D.M.P.A.; SILVA, M.C.F.; MELLO, S.C.M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2005. 30 p. (Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa 177).
- BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Bethesda, v. 109, p. 325-332, 2001.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Sevilla, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W. **Seleção de microrganismos antagônicos a *P. oryzae* para o controle da Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.)**. 1988. 140 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (ed.). **Manual de Fitopatologia**. Princípios e Conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, p.717-728.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.
- CAMPOS, T.; CANÉCHIO FILHO, V. **Principais culturas**. 2. ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973. 410 p.
- CARVALHO, N.M.; VANZOLINI, S. Considerações sobre o vigor de sementes e o desenvolvimento de novas tecnologias para sua avaliação. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.14, n.1, p. 44-55, 2004.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; NERBASS, F. R. Implicações epidemiológicas da transmissão de fungos em sementes de milho. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 6., 2006, Lavras. **Manejo integrado de doenças de grandes culturas: feijão, batata, milho e sorgo**. Lavras: UFLA, 2006, p. 202-212.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA- CIB. **Guia do milho 2009: tecnologia do campo à mesa**. [S.l.: s.n.], 2009. Disponível em: <<http://www.cib.org.br>>. Acesso em: 21 jul. 2011.

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Teste de vigor baseados na permeabilidade de membranas celulares: II Lixiviação de potássio. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 37-41, 1995.

FANCELLI, A.L.; DOURADO, N, D. **Milho: estratégias de manejo para alta produtividade**. Piracicaba. ESALQ/USP. 208p, 2003.

FANCELLI, A. L.; DOURADO, N. D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

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 de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 1, p. 121-127, 2003.

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

HARLAPUR, S. I.; KULKARNI, M. S.; SRIKANT KULKARNI PATIL, B. C. Assessment of crop loss due to turcicum leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs in maize. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 62, n. 2, p. 144-154, 2009.

HADAR, Y.; HARMAN, G. E.; TAYLOR, A. G. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma harzianum* from New York soils for biological control seed rot caused by *Pythium* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 1, p. 106-110, Jan. 1984.

HENNING, A.A.; KRZYZANOWSKI, F.CJ; FRANCA NETO, J.B.J; YORINORI, J.TJ. **Tratamento de sementes de soja com fungicida**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1991. 4 p.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: EMBRAPA- CNPSO, 2005. 52 p.

HERMOSA, M.R.,; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E.A.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Environmental Microbiology**, Bethesda, v.66, p.1890-1898, 2000.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. (ed.). **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.

- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma*: plant interaction and its effects on increased growth response. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 144, n. 2, p. 267-272, 1992.
- KOMMEDAHL, T.; WINDELS, C. E.; SABRINI, G.; WILEY, H. B. Variability in performance of biological and fungicidal seed treatment in corn, peas and soybeans. **Protection Ecology**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 55-61, 1981.
- KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.
- LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.54, n.1/2, p.89-96, 1997.
- LIMA, E.A.; CHAGAS, B.L.; SILVA, V.P.; POMELLA, A.W.V. Efeito de *Trichoderma asperellum* no cultivo do alho, associado ou não com tratamento químico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.319, 2007.
- LIMA, F. F. ***Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.
- LUCCA FILHO, O.A. Diagnóstico da patologia de sementes de milho no Estado do Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 1., 1984, Piracicaba, Situação e perspectivas da patologia de sementes no Brasil. **Anais...** Piracicaba: CENA/USP/CNEN, Brasília: ABRATES, 1984. p.102-104.
- LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. das S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.
- LUZ, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.1, p.16-20, 2001.
- LUZ, W.C. **Tratamento de sementes de milho com fungicidas**. 2ª edição, Passo Fundo, Embrapa Trigo. 1997. 24 p.(Circular Técnica nº 7).
- MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.4, n. 2, p. 33-35, 1994.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination, aid in selection and evolution for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.
- MARTINS-CORDER, M.P.P.; MELO, I.S. de. Influência de *Trichoderma viride* e *T. koningii* na emergência de plântulas e no vigor de mudas de berinjela. **Revista Brasileira de Biologia**, Piracicaba, v.57, n.1, p.39-45, 1997.
- MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230 p.

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfii* Sacc. **Fitosanidade**, Brasília, v.11, n.1, p.3-9, 2007.

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, Brasília. **Resumos...**, Brasília: SBF, 1992. p. 159.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p.121-127, 2008.

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

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

OLIVEIRA, G.G. ***Trichoderma* spp. no crescimento vegetal e no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* e de patógenos em sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius*)**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimentão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.20, n.2, p.306-310, 1998.

PATERNIANI, R.S.; REIS, R.A.; VIEIRA, R.D.; RODRIGUES, L.R.A.; COAN, O. Avaliação de genótipos de aveia quanto à produção e qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.17, n.1, p.36-41, 1995.

PATERNIANI, E.; GOODMAN, M.M. **Races of maize in Brazil and adjacent areas**. Cidade do México, Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo, 1977. 95 p.

PEREIRA, **SPSS**: guia prático de utilização: análise de dados para Ciências Sociais e Psicologia. 6ª Ed. Lisboa: Sílabo, 2006, 248 p.

PEREIRA, O.A.P. Tratamento de sementes de milho. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., 1986, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.145-159.

PINTO, N. F. J. A.; ANGELIS, B.; HABE, M. H. Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da Cercosporiose (*Cercospora zae-maydis*) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 139- 145, 2004.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 284-288, 1997.

- RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plants growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, p. 1158-1164, 1998. 80 p.
- REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80 p.
- RESENDE, M.L.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VON, R.G.P.; VIEIRA, A.R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n.4, p.793-798, 2004.
- SANDINI, I.E.; FANCELLI, A.L. **Milho: estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. 209 p.
- SANHUEZA, R. M. V. Controle biológico de doenças de fruteiras de clima temperado. In: VII REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: UFSM e EMBRAPA Uva e Vinho, 2001, p. 61-68.
- SOUZA, A.A.; BRUNO, R.L.A.; ARAÚJO, E.; BRUNO, G. B. Micoflora e qualidade fisiológica de sementes do algodoeiro tratadas com fungicidas químicos e extrato de aroeira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, p.56-64, 2003.
- SCHISLER, D. A.; SLININGER, J. P.; BEHLE, W. R.; JACKSON, A. M. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 1267-1271, 2004.
- TANAKA, M.A.S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 26, p. 60-64, n. 1, Mar. 2001.
- TRENTO, S. M.; IRGANG, H. H.; REIS, E. M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **World agricultural supply and demand estimates**. Disponível em: <<http://usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>> Acesso em: 13 de março de 2012.
- WILHELM, E.; ARTHOFER, W.; SCHAFLEITNER, R.; KREBS, B. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 52, n. 1/2, p. 105-108, 1998.
- WULFF, E. G.; MGUNI, C. M.; MORTENSEN, C. N.; KESWANI, C. L.; HOCKENHULL, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 4, p. 317-325, 2002.
- YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, K. Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, n. 2, p. 235-242, 2001.

ANEXOS

ANEXO A – Quadro de Análise de Variância para variável germinação e teste de significância a 5% pelo teste de F, UFU-ICIAG, Uberlândia-MG, 2011

FV	GL	SQ	QM	Fc	Ft
Híbrido	1	18.000000	18.000000	0.552	0.4658
Produto	3	171.125000	57.041667	1.749	0.1877
Híbrido*Produto	3	175.250000	58.416667	1.791	0.1797
Bloco	3	339.625000	113.208333	3.471	0.0343
Erro	21	684.875000	32.613095		
Total corrigido	31	1388.875000			
CV (%) =	6.44				
Média geral:	88.6875000				

ANEXO B - Quadro de Análise de Variância para variável vigor (primeira leitura) e teste de significância a 5% pelo teste de F, UFU-ICIAG, Uberlândia-MG, 2011.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Ft
Híbrido	1	210.114750	210.114750	1.932	0.1791
Produto	3	583.369751	194.456584	1.788	0.1802
Híbrido*Produto	3	151.391751	50.463917	0.464	0.7104
Bloco	3	11153.152251	3717.717417	34.189	0.0000
Erro	21	2283.563752	108.741131		
Total corrigido	31	14381.592255			
CV (%) =	44.26				
Média geral:	23.562687				

ANEXO C - Quadro de Análise de Variância para variável, índice de velocidade de emergência e teste de significância a 5% pelo teste de F, UFU-ICIAG, Uberlândia-MG, 2011.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Ft
Híbrido	1	5.611250	5.611250	0.843	0.3691
Produto	3	26.553137	8.851046	1.329	0.2915
Híbrido*Produto	3	32.856250	10.952083	1.645	0.2093
Bloco	3	161.631063	53.877021	8.091	0.0009
Erro	21	139.832388	6.658685		
Total corrigido	31	366.484088			
CV (%) =	37.83				
Média geral:	6.8218750				

ANEXO D - Quadro de Análise de Variância para variável, porcentagem de germinação e teste de significância a 5% pelo teste de F, UFU-ICIAG, Uberlândia-MG, 2011.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Ft
Híbrido	1	81.281250	81.281250	0.976	0.3343
Produto	3	268.843750	89.614583	1.077	0.3804
Híbrido*Produto	3	1417.09375	472.364583	5.674	0.0052
Bloco	3	323.093750	107.697917	1.294	0.3026
Erro	21	1748.15625	83.245536		
Total corrigido	31	3838.468750			
CV (%) =	24,47				
Média geral:	37.2812500				

ANEXO E - Quadro de Análise de Variância para variável, sanidade de sementes (*Fusarium* sp.) e teste de significância a 5% pelo teste de F, UFU-ICIAG, Uberlândia-MG, 2011.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Ft
Híbrido	1	56.250000	56.250000	0.692	0.4091
Produto	3	110994.750000	36998.250000	454.963	0.0000
Híbrido*Produto	3	600.750000	200.250000	2.462	0.0719
Erro	56	4554.000000	81.321429		
Total corrigido	63	116205.750000			
CV (%) =	12,56				
Média geral:	71,8125				

ANEXO F - Quadro de Análise de Variância para variável, sanidade de sementes (*Penicillium* sp.) e teste de significância a 5% pelo teste de F, UFU-ICIAG, Uberlândia-MG, 2011.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Ft
Híbrido	1	27.562500	27.562500	0.384 ^{ns}	0.5380
Produto	3	133101.687500	44367.229167	618.128	0.0000
Híbrido*Produto	3	768.687500	256.229167	3.570	0.0196
Erro	56	4019.500000	71.776786		
Total corrigido	63	137917.437500			
CV (%) =	16.48				
Média geral:	51.4062500				