



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

**USO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTES DE**  
**SANIDADE DE SEMENTES DE GIRASSOL**

**BEATRIZ ALEMONGE DE SOUZA FALLEIRO**

**CUIABÁ - MT**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**USO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTES DE  
SANIDADE DE SEMENTES DE GIRASSOL**

**BEATRIZ ALEMONGE DE SOUZA FALLEIRO**

Engenheira Agrônoma

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. LEIMI KOBAYASTI

Co- orientador: Pesq. Dr. NELSON DIAS SUASSUNA

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

CUIABÁ - MT

2008

F194u Falleiro, Beatriz Alemonge de Souza  
Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de girassol. Beatriz Alemonge de Souza Falleiro – Cuiabá: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.  
Xii, 59 p.: il. Color.

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

Bibliografia: p. 49 – 54.

CDU 632.4

#### Índice para Catálogo Sistemático.

1. Agronomia. 2. Doenças das Plantas. 3. Fungos. 4. Sementes de Girassol. 5. Teste de Sanidade. I. Universidade Federal de Mato Grosso.

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


**Título:** Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de girassol

**Autora:** BEATRIZ ALEMONGE DE SOUZA FALLEIRO

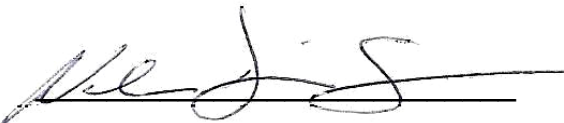
**Orientadora:** Dra. LEIMI KOBAYASTI

Aprovada em 09 de junho de 2008

Comissão Examinadora:



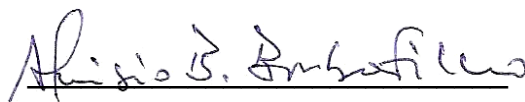
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Leimi Kobayasti  
(FAMEV/UFMT)  
(Orientadora)



Dr. Nelson Dias Suassuna  
(Embrapa Algodão)  
(Co-orientador)



Prof. Dr Daniel Cassetari Neto  
(FAMEV/UFMT)



Prof. Dr Aluísio B. Borba Filho  
(FAMEV/UFMT)

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho Artur, pelo tempo precioso cedido.

Ao meu marido, Rodrigo pelo carinho, incentivo e compreensão.

À minha mãe Marilene “*in memoriam*”, pelos exemplos e ensinamentos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vitória.

À Universidade Federal do Mato Grosso, pela oportunidade de realização do Curso.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa de estudo.

À Embrapa Algodão (CNPQ) pela oportunidade de estágio e pelo apoio para realização dos experimentos da dissertação.

À Professora Leimi Kobayashi, pela orientação.

Ao Pesquisador da Embrapa Algodão e Co-Orientador Dr. Nelson Dias Suassuna, pelo apoio, incentivo e orientação.

Ao Pesquisador da Embrapa Algodão Wirtton Macedo Coutinho, pela valiosa orientação, ensinamentos, apoio e paciência.

Aos Professores e Pesquisadores Drs. Walter Esfrain Pereira (CCA-UFPB); José Wellington dos Santos (Embrapa Algodão), José Airton Rodrigues Nunes (UFPI) e João Luís da Silva Filho (Embrapa Algodão), pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao Pesquisador Ailton Reis (Embrapa Hortaliças), pelos artigos científicos e pela grande amizade.

Aos Pesquisadores Regina Maria Villas Boas de Campos Leite (CNPQ) e Ademar Roque Zanatta (Embrapa Transferência de Tecnologia), pelas sementes cedidas.

A Pesquisadora Maria José da Silva e Luz pelo auxílio na revisão de português.

À Taís de Moraes Falleiro Suassuna e Nelson Dias Suassuna, pelo carinho, apoio, amparo e socorro nos momentos difíceis.

Aos Funcionários e amigos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão que muito me ajudaram na realização deste trabalho: Joseni Ferreira da Silva, Pollyne Borborema Alves de Almeida, Fabíola Vanessa de França e Silva, Litervaldo Pereira Machado, Amanda de Melo Gonçalves, Clarice Machado da Luz, Jefferson Araújo Silva e Marcelo Garcia Oliveira.

A Rosane Segalla, pelo convívio e grande amizade

Ao amigo Rafael Martins Valadão, pelo auxílio na formatação da dissertação.

Aos meus familiares, pelo amor e incentivo.



## USO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA EM TESTES DE SANIDADE DE SEMENTES DE GIRASSOL

**RESUMO** – Avaliou-se o uso dos solutos osmóticos cloreto de sódio e manitol para inibir e/ou retardar a germinação de sementes e o comprimento de radícula de plântulas de girassol submetidas aos testes de sanidade. Avaliou-se também, nesses testes, a influência da restrição hídrica na detecção da micoflora associada às sementes ou plântulas. Foram testados os níveis de restrição hídrica de -0,8 MPa, -1,0 MPa, -1,2 MPa e -1,4 MPa no substrato utilizado para incubar as sementes de girassol. O crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Alternaria alternata* e *Alternaria zinniae*, que se associam às sementes de girassol, foi também avaliado em meio de BDA osmoticamente modificado com os mesmos solutos e níveis de restrição, variando de -0,35 MPa (BDA padrão) a 1,4 MPa. A restrição hídrica do substrato induzida pelos solutos testados, nos níveis avaliados, reduziu a germinação e o comprimento de radícula e não interferiu na detecção dos fungos, além de propiciar uma leitura mais rápida e uma melhor identificação dos fungos associados às sementes. A restrição hídrica do meio BDA, induzida por manitol nos diferentes potenciais osmóticos testados, estimulou o crescimento micelial *in vitro* tanto de *A. alternata* quanto de *A. zinniae*, enquanto o meio modificado com NaCl estimulou o crescimento micelial de *A. alternata*, afetando adversamente o crescimento micelial de *A. zinniae*.

**Palavras-chave:** *Helianthus annuus*, NaCl, manitol.

## USE OF THE WATER RESTRICTION TECHNIQUE IN SUNFLOWER SEED HEALTH TESTING

**ABSTRACT** - The aim of this work was to investigate the feasibility of using a water restriction technique by using osmotic solutes to control sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination in blotter tests. The effects of water potential of substrates osmotically modified with sodium chloride or mannitol were evaluated for seed germination, radicle length and mycoflora present in the samples. The effects of levels of osmotic potentials ranging from -0.35 MPa (MegaPascal) to -1.4 MPa were also investigated on mycelial growth of the fungi *Alternaria alternata* and *Alternaria zinniae* on PDA (Potato – Dextrose – Agar) medium. All osmotic potentials were able to inhibit or to retard seed germination to the extent that seed examination under a stereomicroscope became easier without affecting seed mycoflora associated to with the seeds. Mycelial growth of *A. alternata* was stimulated by all osmotic solutes tested, while mycelial growth of *A. zinniae* was stimulated by mannitol and affected by all NaCl osmotic potential levels used.

**Key words:** *Helianthus annuus*, NaCl, mannitol.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1 Germinação e comprimento de radícula (cm) de sementes de girassol (lote 1) submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos..	32
2 Germinação e comprimento de radícula (cm) de sementes de girassol (lote 2) submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos..	33
3 Germinação e comprimento de radícula (cm) de sementes de girassol (lote 3) submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos..	34
4 Sementes de girassol submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha A) e papel de filtro com restrição hídrica (manitol) nos potenciais osmóticos: -0,8 MPa (B), -1,0 MPa (C), -1,2 MPa (D) e -1,4 MPa (E).....	35
5 Crescimento micelial de <i>A. alternata</i> em meio BDA (A) e em BDA modificado osmoticamente em diferentes potenciais -0,8 MPa (B); -1,0 MPa (C); -1,2 MPa (D) e -1,4 MPa (E).....	41
6 Diâmetro médio da colônia de <i>A. alternata</i> em meio BDA modificado osmoticamente com NaCl e manitol em diferentes potenciais osmóticos.	42
7 Crescimento micelial de <i>A. zinniae</i> em meio BDA (A) e em BDA modificado osmoticamente em diferentes potenciais -0,8 MPa (B); -1,0 MPa (C); -1,2 MPa (D) e -1,4 MPa (E).....	43
8 Diâmetro médio da colônia de <i>A. zinniae</i> em meio BDA modificado osmoticamente com NaCl em diferentes potenciais osmóticos.....	44
9 Diâmetro médio da colônia de <i>A. zinniae</i> em meio BDA modificado osmoticamente com manitol em diferentes potenciais osmóticos.....	45

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
1 Quantidade de produto utilizado para preparação das soluções de NaCl e manitol, nos diferentes níveis de potencial osmótico testados. Campina Grande, PB, 2007.....	26
2 Quantidade de NaCl e manitol utilizada para preparar as soluções osmóticas em substituição à água utilizada no preparo do meio BDA, em diferentes níveis de potencial osmótico. Campina Grande, PB, 2007.	29
3 Incidência (%) de fungos em três lotes de sementes de girassol submetidos ao teste de sanidade pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão - <i>blotter test</i> (testemunha) e incubação em papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos. Campina Grande, PB, 2007.....	38

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1 Incubação em papel de filtro ( <i>blotter test</i> ).....	16
2.2 Relações hídricas.....	18
2.2.1 Relações hídricas em sementes.....	19
2.2.2 Relações hídricas em microrganismos.....	19
2.3 Germinação e restrição hídrica em sementes.....	20
2.4 Crescimento fúngico em condições de estresse hídrico.....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Avaliação da restrição hídrica sobre germinação de sementes de girassol e ocorrência de fungos.....	25
3.1.1 Análise Estatística.....	27
3.2 Avaliação da restrição hídrica em relação ao crescimento micelial dos fungos do gênero <i>Alternaria</i> que se associam às sementes de girassol.....	28
3.2.1 Crescimento micelial em meio de cultura osmoticamente modificado.....	28
3.2.2 Análise Estatística.....	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
4.1 Germinação de sementes e comprimento de radícula de plântulas de girassol submetidas a testes de sanidade padrão e com restrição hídrica.....	31
4.2 Incidência de fungos associados a sementes de girassol submetidas a testes de sanidade padrão e com restrição hídrica.....	37
4.3 Crescimento micelial de fungos do gênero <i>Alternaria</i> que se associam às sementes de girassol em meio de cultura com restrição hídrica.....	41
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49
<b>7 ANEXO</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma espécie que possui ampla capacidade de adaptação e de cultivo em diferentes condições edafoclimáticas do Brasil. Essa oleaginosa possui características agronômicas desejáveis, como tolerância à seca, ao frio e ao calor, além de ser uma ótima opção nos sistemas de rotação e sucessão de culturas nas regiões produtoras de grãos. Atualmente, o girassol vem se destacando no cenário nacional, como uma das principais fontes de matéria-prima para a produção de biocombustível (Castro et al., 1997; Paes, 2005).

A expansão da cultura, porém, pode ser prejudicada, entre outros fatores, pela presença de doenças causadas, principalmente, por fungos. Dentre as doenças de maior importância, destaca-se a mancha de alternaria que ocorre, praticamente, em todas as regiões onde o girassol é cultivado no Brasil. A doença diminui a área fotossintética da planta, causa desfolha precoce e, em consequência, redução da produção (Ungaro, 2000).

A mancha de alternaria é ocasionada por diversas espécies do gênero *Alternaria* que causam sintomas semelhantes na planta. No Brasil, são relatadas três espécies do fungo patogênicas à cultura do girassol: *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki e Nishihara, *A. zinniae* Ellis e *A. alternata* (Fr.) Keissler. A sobrevivência desses patógenos pode ocorrer por meio de restos de cultura contaminados e/ou por sementes contaminadas ou infectadas. Nesse último caso, os fungos são transportados de uma região

para outra, aderidos superficialmente ao tegumento ou associados aos tecidos internos das sementes. Internamente à semente, esses patógenos podem permanecer viáveis por muitos anos (Godoy e Fernandes, 1985).

O uso de sementes livres desses patógenos é uma das táticas mais eficazes no manejo da mancha de alternaria em girassol. Entretanto, o uso de sementes sadias depende da confiabilidade dos testes de sanidade empregados para a detecção de patógenos em sementes.

O teste de sanidade tem como objetivo determinar a condição sanitária de um lote de sementes, fornecendo informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, tratamento de sementes, melhoramento de plantas e outros (Machado, 2000, Henning, 2004).

A escolha do método utilizado na análise sanitária depende do tipo de patógeno, das condições disponíveis e dos propósitos do teste. Dentre os vários métodos existentes de detecção de patógenos em sementes, o método de incubação em substrato de papel (*blotter test*) é o mais utilizado. Esse método é aplicado para quase todos os tipos de sementes, incluindo sementes de cereais, hortaliças, plantas ornamentais e essências florestais, na detecção de vários fungos (Neergaard, 1979).

Nos testes de sanidade de algumas espécies vegetais, como, por exemplo, o girassol, a germinação rápida, durante o período de incubação em substrato de papel, dificulta a identificação dos fungos associados às sementes e pode comprometer a validade dos resultados pela possibilidade de contaminações secundárias entre as sementes e o exterior do recipiente.

Para inibir a germinação das sementes ou reduzir o comprimento das plântulas, são recomendados, em geral, o uso do sal de sódio do ácido 2,4-D (2,4- diclorofenoxiacetato de sódio) ou o congelamento das sementes (Brasil, 1992; Machado, 1988). Esses procedimentos, entretanto, têm limitações de uso. O 2,4-D, por exemplo, pode ser fungitóxico, caso utilizado acima de 25 µg/L, além de ser carcinogênico. O congelamento pode favorecer, em muitos casos, o desenvolvimento de bactérias saprofitas nos testes de sanidade (Limonard, 1968), além de problemas operacionais.

A técnica da restrição hídrica, utilizando-se solutos iônicos e não iônicos, tem sido utilizada, com sucesso, em substituição ao 2,4-D e ao congelamento para inibir a germinação de sementes em testes de sanidade realizados em substrato de papel (Coutinho et al., 2001; Farias et al., 2003; Machado et al., 2003).

Nesse trabalho, manitol e cloreto de sódio (NaCl) foram avaliados como restritores hídricos, para inibir a germinação de sementes de girassol submetidas a testes de sanidade pelo método de incubação em substrato de papel de filtro (*blotter test*).

Os objetivos específicos desse trabalho foram: *i*) quantificar a germinação de sementes, comprimento de radícula e identificar a micoflora associada às sementes ou plântulas de girassol submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, *ii*) quantificar o crescimento micelial dos fungos *Alternaria alternata* e *Alternaria zinniae* em meio de cultura com diferentes potenciais osmóticos



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Incubação em papel de filtro (*blotter test*)

A escolha do método utilizado na análise sanitária depende do tipo de patógeno, das condições disponíveis e dos propósitos do teste. Dentre as várias técnicas existentes de detecção de patógenos em sementes, a incubação em substrato de papel (*blotter test*) é a mais utilizada, podendo ser aplicada para quase todos os tipos de sementes, incluindo sementes de cereais, hortaliças, plantas ornamentais e essências florestais na detecção de vários fungos associados à amostra analisada (Neergaard, 1979).

A incubação em substrato de papel é uma combinação entre a câmara úmida e o teste de germinação. Essa técnica tem como base a avaliação de sinais desenvolvidos na plântula, por ocasião de sua germinação em condições controladas (Neergaard, 1979; Machado, 1988).

O método consiste em adicionar as sementes eqüidistantes em recipientes esterilizados com tampas transparentes (placas de Petri ou caixas tipo “*gerbox*”), contendo três folhas de papel de filtro, previamente esterilizadas e umedecidas em água destilada esterilizada. Os recipientes com as sementes são mantidos em câmara de incubação com temperatura de  $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por um período de sete dias, em luz com comprimento de onda próximo ao ultra-violeta (Limonard, 1968). A identificação dos fungos é baseada nas suas características morfológicas

visualizadas em microscópio estereoscópico com resolução de até 80 vezes (Neergaard, 1979).

Em algumas espécies vegetais, a germinação rápida das sementes dificulta a identificação dos fungos e pode comprometer a validade dos resultados desses testes pela possibilidade de contaminações secundárias entre as sementes e o exterior do recipiente (Machado, 1988). Para inibir a germinação das sementes ou reduzir o comprimento de radículas, são recomendados, em geral, a adição do sal de sódio do ácido 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato de sódio) na água utilizada para umedecer o papel de filtro, ou o congelamento das sementes a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Machado, 1988; Brasil, 1992).

Embora eficiente em inibir a germinação de sementes ou reduzir o comprimento de radículas, o uso do 2,4-D pode ser fungitóxico, caso utilizado acima de  $25\ \mu\text{g/L}$  (Limonard, 1968), além de ser carcinogênico. O congelamento provoca a morte das sementes pela ruptura das células, produzindo exsudatos que são drenados no substrato de papel, podendo provocar contaminações secundárias, principalmente por bactérias saprofitas (Limonard, 1968).

A técnica da restrição hídrica tem sido utilizada, com sucesso, em substituição ao 2,4-D e ao congelamento no controle da germinação de sementes em testes de sanidade realizados em substrato de papel e em meio agarizado (Coutinho et al., 2001). Esta técnica é uma variação do *blotter test* e baseia-se na alteração do potencial osmótico da solução de embebição do substrato ou do meio de cultura, via adição de solutos, ajustando-o a potenciais hídricos que não permitam absorção de água suficiente para que ocorra a germinação das sementes ou reduza o comprimento da radícula (Henning, 2004).

Vários estudos foram realizados, utilizando-se diferentes solutos, tais como NaCl, Cloreto de potássio (KCl), manitol, e polietileno glicol (PEG), para inibir e/ou retardar a germinação de sementes em testes de sanidade e na inoculação de fungos em sementes de diversas espécies vegetais, como

feijoeiro, algodoeiro, arroz, milho e trigo (Coutinho et al., 2001; Farias et al., 2003; Machado et al., 2003; Machado et al., 2004; Teixeira et al., 2005).

Machado et al. (2007) verificaram que não houve interferência na detecção dos fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Snyder & Hansen, *Lasioidiplodia theobromae* (Pat.) Griff & Maubl. (= *Botryodiplodia theobromae* (Pat.)), *Colletotrichum gossypii* South. e *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa, em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica induzida por NaCl e manitol no potencial osmótico de -1,0 MPa.

Em estudos visando ao controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade, Coutinho et al. (2001) constataram que a restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e KCl nos potenciais osmóticos entre -0,4 a -0,9 MPa, não interferiu na detecção dos principais fungos transmitidos pelas sementes dessas espécies em testes de sanidade realizados pelo método de incubação em papel de filtro. Também Machado et al. (2003), em trabalho semelhante, com sementes de soja (*Glycine max* L.), não constataram diferenças entre os tipos de restritores hídricos utilizados (manitol, NaCl e KCl) nos diferentes potenciais utilizados, na detecção da micoflora associada às sementes.

Em testes de sanidade de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.), Farias et al. (2003) observaram que a restrição hídrica induzida por NaCl, KCl, manitol e sacarose, nos potenciais de -0,4 a -1,0 MPa, é eficiente para inibir ou retardar a germinação, não interferindo na detecção de fungos associados às sementes.

## 2.2 Relações hídricas

O potencial hídrico é a diferença entre o potencial químico da água em um sistema, ou parte desse sistema, e o potencial químico da água livre, em condições iguais de pressão atmosférica e temperatura (Duniway, 1979). Ao potencial químico da água pura é convencionado o valor zero de

potencial de energia (Cook e Papendick, 1978). O potencial hídrico é uma grandeza que pode ser apresentada nas formas de energia por unidade de volume, de massa ou de peso. A energia por unidade de volume possui dimensões físicas de pressão. O potencial hídrico pode ser expresso em unidade de pressão como o MegaPascal - MPa (Villela et al., 1991).

### 2.2.1 Relações hídricas em sementes

O potencial hídrico das células de uma semente possui três componentes principais: o potencial matricial ou mátrico, o potencial osmótico e o potencial de pressão (Bewley e Black, 1994). O potencial hídrico das sementes pode ser expresso pela equação  $\Psi = \Psi_s + \Psi_m + \Psi_p$ , sendo  $\Psi$  o potencial hídrico total, e  $\Psi_s$ ,  $\Psi_m$ ,  $\Psi_p$ , respectivamente, potencial osmótico, potencial mátrico e potencial de pressão (Duniway, 1979).

O potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) representa o efeito de solutos dissolvidos na água. Os solutos reduzem a energia livre da água, assumindo valores negativos ou iguais a zero para água pura (Salisbury e Ross, 1992). O potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) representa a redução do potencial hídrico pela ação de forças de adsorção ou capilaridade resultantes da interação da água com certas matrizes (Duniway, 1979), enquanto o potencial de pressão ( $\Psi_p$ ), também denominado potencial de turgor, é determinado pela pressão exercida pela parede celular sobre o conteúdo celular, quando a célula está túrgida. A soma dos três termos confere um valor negativo para o potencial hídrico, exceto para células completamente túrgidas, que se aproxima de zero (Bewley e Black, 1994).

### 2.2.2 Relações hídricas em microrganismos

Em um sistema hídrico, a água flui naturalmente por difusão em um gradiente decrescente de potencial hídrico até o estabelecimento do equilíbrio do mesmo (Salisbury e Ross, 1992). O valor do potencial hídrico da célula microbiana é igual ao valor do potencial hídrico do ambiente ao seu redor, sendo essa relação expressa pela equação  $\Psi_{\text{ambiente externo}} = \Psi_{\text{pressão da célula}} + \Psi_{\text{osmótico da célula}}$ , negligenciando o componente mátrico (Cook e

Papendick, 1972). Se o potencial hídrico da célula microbiana for menor do que o ambiente ao seu redor, a água fluirá do ambiente para a célula até o equilíbrio ser alcançado. O processo inverso também é válido. Se o potencial hídrico da célula microbiana for maior do que o ambiente ao seu redor, a água fluirá para fora da célula até o equilíbrio hídrico com o ambiente ser alcançado. Esse último processo resulta em perda de turgor da célula, sendo que, com a continuidade de perda de água, a célula pode sofrer dessecação e morrer, a menos que o microrganismo seja capaz de desenvolver estruturas de resistência ao estresse hídrico ou desenvolver um potencial osmótico menor por osmorregulação (Cook e Papendick, 1978).

A osmorregulação é o fenômeno pelo qual as células ajustam-se a grandes mudanças no potencial osmótico do ambiente (Salisbury e Ross, 1992). Esse processo não é bem conhecido, mas é provavelmente um importante mecanismo pelo qual os microrganismos mantêm o turgor e também o equilíbrio do potencial hídrico entre suas células e o ambiente ao seu redor (Cook e Papendick, 1978).

### **2.3 Germinação e restrição hídrica em sementes**

A germinação de sementes é uma seqüência ordenada de eventos metabólicos que resulta na retomada do desenvolvimento do eixo embrionário, originando uma plântula (Marcos Filho, 1896; Carvalho e Nakagawa, 2000). Esse processo é iniciado pela entrada de água na semente por embebição. A velocidade de reidratação da semente depende da espécie, da permeabilidade do tegumento à água, da disponibilidade da água no solo, da composição química da semente, da temperatura, da pressão hidrostática e da condição fisiológica da semente (Popinigis, 1985; Bewley e Black, 1994; Carvalho e Nakagawa, 2000; Marcos Filho, 2005).

Durante a germinação, as sementes têm um padrão trifásico de embebição. Na fase I, ocorre absorção rápida de água e o início da degradação das reservas das sementes. Na fase II ocorre o transporte de substâncias desdobradas na fase anterior para o tecido meristemático e por pequenas mudanças no conteúdo de água das sementes. Na fase III da

germinação as substâncias desdobradas na fase I e transportadas na fase II são organizadas em substâncias complexas para formar o citoplasma, o protoplasma e a parede celular, permitindo o crescimento do eixo embrionário (Bewley e Black, 1994; Carvalho e Nakagawa, 2000.)

Com base na seqüência dos eventos do processo de germinação, vários estudos foram desenvolvidos envolvendo técnicas de controle de hidratação e germinação de sementes, das quais se destacam o condicionamento osmótico de sementes, também referido como “priming” e condicionamento fisiológico (Heydecker et al., 1975; Eira e Marcos Filho, 1990a; Eira e Marcos Filho, 1990b; Braccini et al., 1996).

A técnica do condicionamento osmótico consiste em colocar as sementes em contato com um substrato, com o potencial hídrico ajustado para que a semente absorva água até um nível, em que todos os processos preparatórios à germinação ocorram (fases I e II) sem, contudo, atingir a fase de crescimento do eixo embrionário e, em conseqüência, a emergência da radícula na fase III (Heydecker et al., 1975; Bradford, 1986).

Vários produtos têm sido utilizados para o ajuste do potencial hídrico de substratos usados no controle da hidratação e da germinação de sementes de diferentes espécies, dentre os quais, solutos iônicos, como  $MgSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $MgCl_2$ ,  $K_3PO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , e não iônicos, como glicerol, manitol e polietileno glicol (Eira e Marcos Filho, 1990a; Eira e Marcos Filho, 1990b; Pill, 1994; Braccini et al., 1996; Costa e Villela, 2006).

Prisco e O'Leary (1970) constataram que o potencial hídrico de -0,8 MPa, induzido por polietileno glicol, inibiu mais a absorção de água pelas sementes de feijoeiro do que o  $NaCl$  utilizado no mesmo potencial hídrico. Nesse estudo, o potencial hídrico de -0,4 MPa reduziu a germinação em ambos os solutos testados. Em estudos semelhantes com sementes de soja, soluções de  $NaCl$ , manitol e polietileno glicol, com potenciais mais negativos que -0,3 MPa, utilizadas para umedecer o substrato, reduziram a germinação de sementes e o vigor das plântulas. Ainda, o potencial hídrico de -0,9 MPa, induzido principalmente por polietileno glicol e  $NaCl$ , afetou severamente a emissão da radícula (Braccini et al., 1996).

O estresse hídrico inibe o processo de crescimento do eixo embrionário e a síntese de parede, afetando a velocidade e reduzindo a germinação (Bewley e Black, 1994; Taiz e Zeiger, 2004). Os baixos potenciais hídricos das soluções, que são utilizadas para umedecer o substrato, provocam redução na germinação devido à diminuição da quantidade de água absorvida pelas sementes. Além do efeito osmótico, alguns autores atribuem a redução da germinação e do vigor das plântulas, à penetração de solutos nas células em níveis tóxicos (Prisco e O'leary, 1970; Van Der Moezel e Bell, 1987; Braccini et al., 1996). Campos e Assunção (1990), entretanto, atribuíram o fato a uma aparente inibição da síntese e/ou atividade de enzimas hidrolíticas necessárias à germinação das sementes, provocada pelos sais em altas concentrações.

Em estudos visando ao controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade, Machado et al. (2003) constataram que o potencial hídrico de -0,4 MPa de soluções osmóticas de NaCl, KCl e manitol, utilizadas para embeber o papel de filtro no teste de sanidade, reduziu o comprimento da radícula quando comparado às sementes que foram incubadas em papel de filtro embebido em água destilada ou em uma solução de sal de sódio do ácido 2,4-D ( $10 \mu\text{l.ml}^{-1}$ ). Esses autores verificaram a inibição quase completa da emissão da radícula quando as sementes foram incubadas em papel de filtro embebido em soluções osmóticas com potenciais de -0,8 e -1,0 MPa.

Em um estudo semelhante, Coutinho et al. (2001) verificaram o efeito inibidor de soluções osmóticas de NaCl, KCl e manitol, utilizadas para embeber o papel de filtro utilizado no teste de sanidade, sobre a emissão da radícula de sementes de arroz e de feijoeiro. Nesse estudo, potenciais osmóticos mais negativos que -0,6 MPa inibiram a germinação das sementes ou reduziram o comprimento de radícula das plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Machado et al. (2004), com sementes de algodoeiro submetidas a testes de sanidade. Esses autores constataram que a utilização de soluções osmóticas preparadas com manitol com potencial hídrico entre -0,8 MPa e -1,0 MPa, utilizadas para embeber o

papel de filtro, proporcionou condições mais apropriadas para impedir a germinação temporária das sementes no teste de sanidade.

#### **2.4 Crescimento fúngico em condições de estresse hídrico**

O potencial hídrico é reduzido quando solutos (açúcares e/ou sais) são adicionados à água, que usa a energia para dissolvê-los, diminuindo assim seu potencial (Castro et al., 2004). Neste sentido, o ajuste do potencial hídrico de substratos agarizados em relação ao desenvolvimento de microrganismos, normalmente, é feito pela adição de solutos osmoticamente ativos, como  $\text{CaCl}_2$  (Alam et al., 1996); KCl, sacarose ou mistura de sais (Gao e Shain, 1995; Alam et al., 1996), ou pela adição de PEG (Brownell e Schneider, 1985; Alam et al., 1996).

O estudo de organismos fitopatogênicos em substrato agarizado, modificado osmoticamente, tem sido de grande interesse tanto em testes de inoculação de fungos em sementes (Machado et al., 2001; Costa et al., 2003; Machado et al., 2004), quanto para inibir ou retardar a germinação de sementes submetidas a testes de sanidade (Coutinho et al., 2001; Farias et al., 2003; Machado et al., 2003).

O crescimento micelial de fungos em meios de cultura osmoticamente modificados com adição de solutos iônicos e não iônicos varia, em função de diferenças na habilidade de absorver água do ambiente. Também foi identificada uma faixa de potencial hídrico adequada ao crescimento de cada espécie (Sommers et al., 1970; Woods e Duniway, 1986; Kackley et al., 1990).

Os oomicetos *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Phytophthora parasitica* Dast. e *Phytophthora megasperma* Drechler var. *sojae* Hild, tiveram seu crescimento micelial alterado com a adição de solutos iônicos (KCl e mistura dos sais NaCl, KCl e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) em meios de cultura. Os potenciais osmóticos de -1,0 MPa e -1,5 MPa, estimularam o crescimento micelial de *P. megasperma*, enquanto potenciais de -1,0 MPa reduziram o crescimento micelial de *P. cinnamomi* e *P. parasitica* (Sommers et al., 1970).



Meios de cultura com potenciais osmóticos entre -0,3 MPa e -1,0 MPa estimularam o crescimento micelial dos fungos *Botrytis cinerea* Pers. e *Alternaria alternata* (Fr) Keissler (Alam et al., 1996), enquanto que potenciais mais negativos que -1,0 MPa reduziram progressivamente o diâmetro das colônias. Os autores atribuíram o efeito estimulador do crescimento micelial dos fungos à absorção de solutos e a um melhor ajuste osmótico das células fúngicas, os quais proporcionaram maior turgor para extensão celular, e a redução do crescimento micelial aos efeitos diretos da restrição hídrica induzida pelos solutos utilizados.

Em outros estudos, meios de cultura com potenciais osmóticos entre -0,3 MPa e -2,0 MPa estimularam o crescimento micelial dos fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* van Tiegh., *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, *Fusarium moniliforme* Sheld. e *Fusarium graminearum* Schw. (Adebayo e Harris, 1971; Wearing e Burgess, 1979; Subbarao et al.; 1993; Gao e Shain, 1995). Nesses estudos, meios de cultura com potenciais osmóticos mais negativos que -2,0 MPa reduziram o crescimento micelial dos fungos.

Machado et al. (2004) verificaram que o meio BDA modificado osmoticamente com manitol, nos potenciais hídricos de -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa, não interferiu no crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e que o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Colletotrichum gossypii* foi estimulado no meio de cultura com potenciais hídricos mais negativos. Em um estudo semelhante, Carvalho et al. (2001) constataram que a adição de manitol ao meio BDA até o nível de - 0,6 MPa favoreceu o crescimento do *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e. Magn.) Scrib. Em ambos os estudos, os autores atribuíram o maior crescimento dos fungos no meio de cultura osmoticamente modificado à fonte adicional de carbono adicionada ao meio de cultura (manitol) e um melhor ajuste osmótico da célula fúngica propiciado pela absorção dos solutos, o qual permitiu maior turgor para extensão celular.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão (Centro Nacional de Pesquisa em Algodão) em Campina Grande, Paraíba, no período compreendido entre os meses de abril a agosto de 2007.

#### 3.1 Avaliação da restrição hídrica sobre germinação de sementes de girassol e ocorrência de fungos

A restrição hídrica foi avaliada nas condições do teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro.

Foram utilizados três lotes de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) da cultivar Embrapa 122-V2000; o lote 1 (safra 2005/2006), proveniente do Escritório de Negócios de Dourados (SNT – Dourados) da Embrapa Transferência de Tecnologia, e os lotes 2 (safra (2005/2006) e 3 (safra 2006/2007), provenientes da Embrapa Soja (Centro Nacional de Pesquisa de Soja).

##### ***Incubação em substrato de papel de filtro padrão (blotter test)***

As sementes foram distribuídas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (25 sementes/placa de Petri), contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em água destilada e esterilizada. As placas, contendo as sementes, foram mantidas em câmara de incubação com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

Ao final desse período, foi determinada a incidência de fungos, examinando-se individualmente as sementes com auxílio de microscópio estereoscópico. Em alguns casos, a identificação foi confirmada pela visualização das estruturas morfológicas dos fungos ao microscópio composto (Ellis, 1971; Barnett e Hunter, 1972).

Após a realização do teste de sanidade, foram determinadas a porcentagem de germinação de sementes de girassol e o comprimento de radícula (cm). Foram consideradas como germinadas as sementes com protrusão de radícula (comprimento maior que 0,1 cm).

***Incubação em substrato de papel de filtro com restrição hídrica***

Distribuíram-se as sementes em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (25 sementes/placa), contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com soluções osmóticas, previamente esterilizadas, de cloreto de sódio (NaCl) e manitol, nos potenciais osmóticos -0,8 MPa, -1,0 MPa, -1,2 MPa e -1,4 MPa. Para calcular a quantidade de NaCl e manitol utilizada na preparação das soluções, nos diferentes níveis de potencial osmótico testados, utilizou-se o software SPPM (Michel e Radcliffe, 1995). A temperatura utilizada para cálculo dos potenciais osmóticos foi 25°C. As quantidades dos solutos utilizados, em gramas/litro de água destilada, para obtenção de cada nível de potencial osmótico das soluções testadas, estão apresentadas na Tabela 1. As sementes foram incubadas e avaliadas nas mesmas condições do método de incubação em papel de filtro padrão.

**TABELA 1.** Quantidade de produto utilizado para preparação das soluções de NaCl e manitol, nos diferentes níveis de potencial osmótico testados. Campina Grande, PB, 2007.

Potencial osmótico (MPa)	g.L <sup>-1</sup> de água destilada	
	NaCl	Manitol
- 0,80	10,23	58,79
- 1,00	12,75	73,49
- 1,20	15,37	88,24
- 1,40	18,00	102,92

### 3.1.1 Análise estatística

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo a parcela (unidade amostral) constituída por uma placa de Petri com 25 sementes, em esquema fatorial  $2 \times 4 + 1$ , dois solutos, quatro potenciais osmóticos e um tratamento adicional (método de incubação padrão – testemunha) para cada lote avaliado. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o software estatístico SAS<sup>®</sup> versão 9.1.3 (SAS Institute, Inc. Care, NC, USA). Para as variáveis porcentagem de germinação e comprimento de radícula, em razão de não se ter verificado homogeneidade de variâncias, a análise estatística foi realizada, utilizando-se modelos lineares generalizados (McCullagh e Nelder, 1989), por meio da rotina GENMOD.

As análises de deviance (testes de razão de verossimilhanças para as fontes de variação controladas no modelo) foram realizadas de forma seqüencial (tipo I). Realizaram-se contrastes entre o tratamento-testemunha e o fatorial, entre solutos, entre níveis de potencial osmótico e entre a interação solutos x potenciais osmóticos. Equações de regressão foram ajustadas aos dados das variáveis analisadas, quando foram verificados efeitos significativos ( $P \leq 0,05$ ) de potenciais osmóticos.

Para a variável porcentagem de germinação, em razão dos resíduos terem distribuição binomial, foi ajustado um modelo linear generalizado com a função ligadora canônica *logit*, sendo a proporção estimada utilizando-se a fórmula:  $p = \frac{\exp(\eta_{jj})}{1 + \exp(\eta_{jj})}$ .

Os dados de incidência dos fungos associados às sementes foram submetidos à análise de variância multivariada (Rencher, 2002), utilizando-se o critério de Wilks, com aproximação de F para o teste de hipótese de igualdade dos vetores de médias de tratamentos, determinando-se os efeitos de solutos, de potenciais osmóticos, da interação entre solutos e potenciais osmóticos e do contraste entre o tratamento testemunha e o fatorial, para cada lote estudado.

### **3.2 Avaliação da restrição hídrica em relação ao crescimento micelial de fungos do gênero *Alternaria* que se associam às sementes de girassol**

Foram utilizados dois isolados de cada patógeno, *Alternaria zinniae* Ellis e *Alternaria alternata*, cujos ensaios foram montados separadamente. Os isolados foram obtidos de sementes de girassol, submetidas à análise sanitária pelo método de incubação em papel de filtro padrão. Os fungos foram cultivados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA (extrato de batata-dextrose-ágar) em incubadora do tipo B.O.D com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias..

#### **3.2.1 Crescimento micelial em meio de cultura osmoticamente modificado**

Foi mensurado o crescimento micelial dos fungos em meio BDA osmoticamente modificado. Foram testados os potenciais osmóticos -0,8 MPa; -1,0 MPa; -1,2 MPa e -1,4 MPa. Os níveis de potencial osmótico foram obtidos, substituindo-se a água utilizada para o preparo do meio BDA por soluções osmóticas de NaCl e manitol. Para calcular a quantidade de NaCl e manitol utilizada na preparação das soluções, nos diferentes níveis de potencial osmótico testados, utilizou-se o software SPPM (Michel e Radcliffe, 1995), levando-se em consideração o potencial osmótico do meio BDA, que é de aproximadamente -0,35 MPa (Sommers et al., 1970; Wearing e Burgess, 1979). A temperatura utilizada para o cálculo dos níveis de potencial osmótico testados foi  $25^{\circ}\text{C}$ . As quantidades dos solutos utilizados, em grama/litro de meio BDA, para obtenção de cada nível de potencial osmótico estão apresentadas na Tabela 2.

**TABELA 2.** Quantidade de NaCl e manitol utilizada para preparar as soluções osmóticas em substituição à água utilizada no preparo do meio BDA, em diferentes níveis de potencial osmótico. Campina Grande, PB, 2007.

Potencial osmótico do meio BDA (MPa)	g.L <sup>-1</sup> de água destilada	
	NaCl	Manitol
- 0,80	5,71	33,10
- 1,00	8,22	47,75
- 1,20	10,84	62,46
- 1,40	13,45	77,12

O meio BDA nos diferentes potenciais osmóticos testados, após esterilização, foi distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, utilizando 20 ml por placa. No centro de cada placa, foi colocado um disco de micélio, de 0,5 cm de diâmetro, dos fungos testados, cultivados previamente em meio BDA. As placas, com inóculo dos fungos, foram mantidas em incubadora do tipo B.O.D, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C, por um período de cinco dias. Após esse período, o diâmetro médio das colônias foi mensurado.

### 3.2.2 Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 2 x 2 x 4 + 1, sendo as combinações entre isolados, solutos e potenciais osmóticos para ajustar o meio BDA e um tratamento adicional (BDA padrão - testemunha). Em razão de não se ter verificado homogeneidade de variâncias, as análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se modelos lineares generalizados, por meio da rotina GENMOD do sistema estatístico SAS<sup>®</sup> versão 9.1.3 (SAS Institute, Inc. Care, NC, USA). As análises de deviance (testes de razão de verossimilhanças para as fontes de variação controladas no modelo) foram realizadas de forma seqüencial (tipo I). Realizaram-se contrastes entre os tratamentos testemunhas e o fatorial, entre testemunhas, entre isolados, entre solutos,

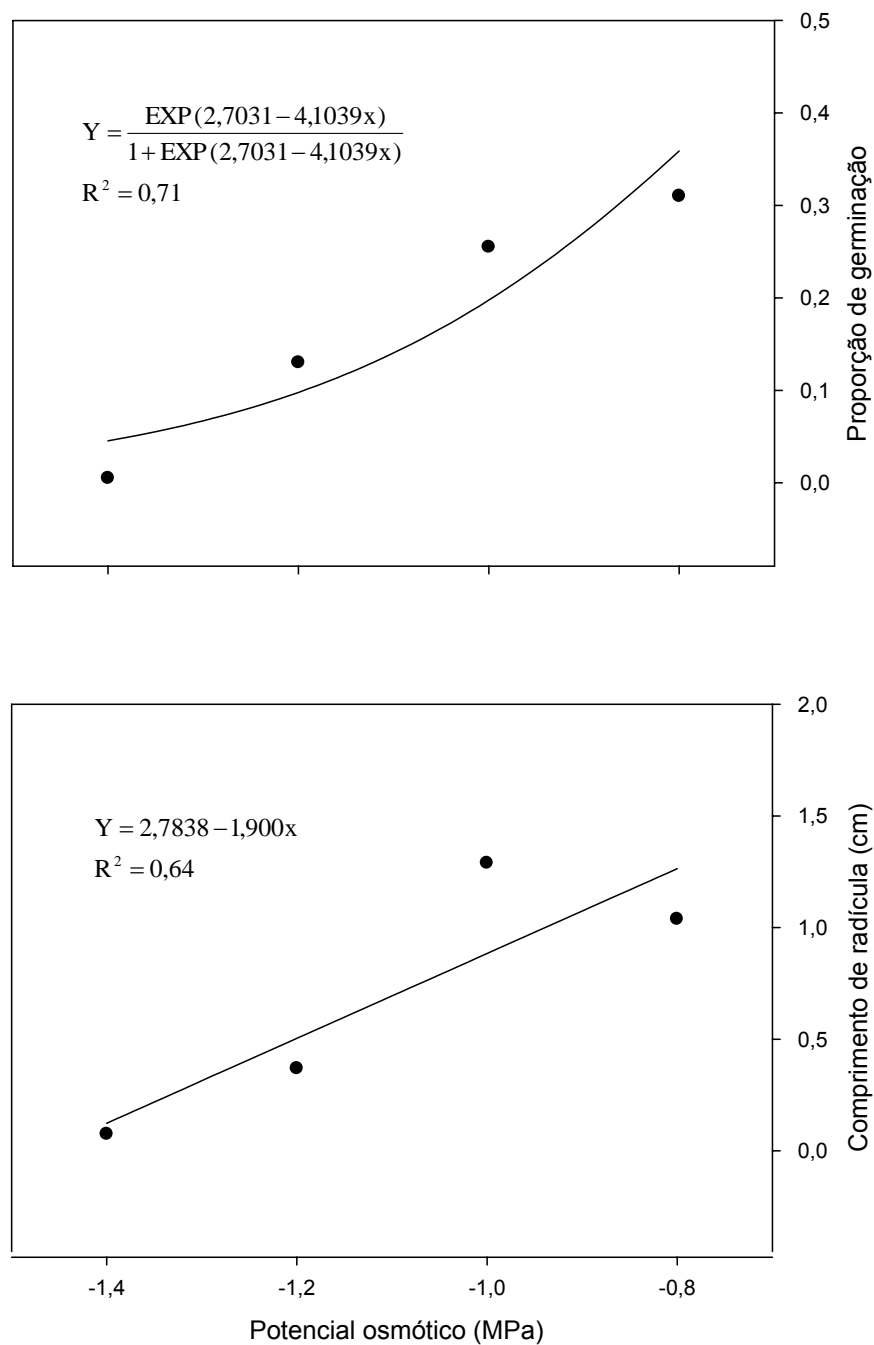
entre potenciais osmóticos e entre interações solutos x potenciais osmóticos, solutos x isolados, isolados x potenciais osmóticos e isolados x solutos x potenciais osmóticos. Equações de regressão foram ajustadas aos dados das variáveis analisadas, quando foram verificados efeitos significativos ( $P \leq 0,05$ ) de potenciais osmóticos.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

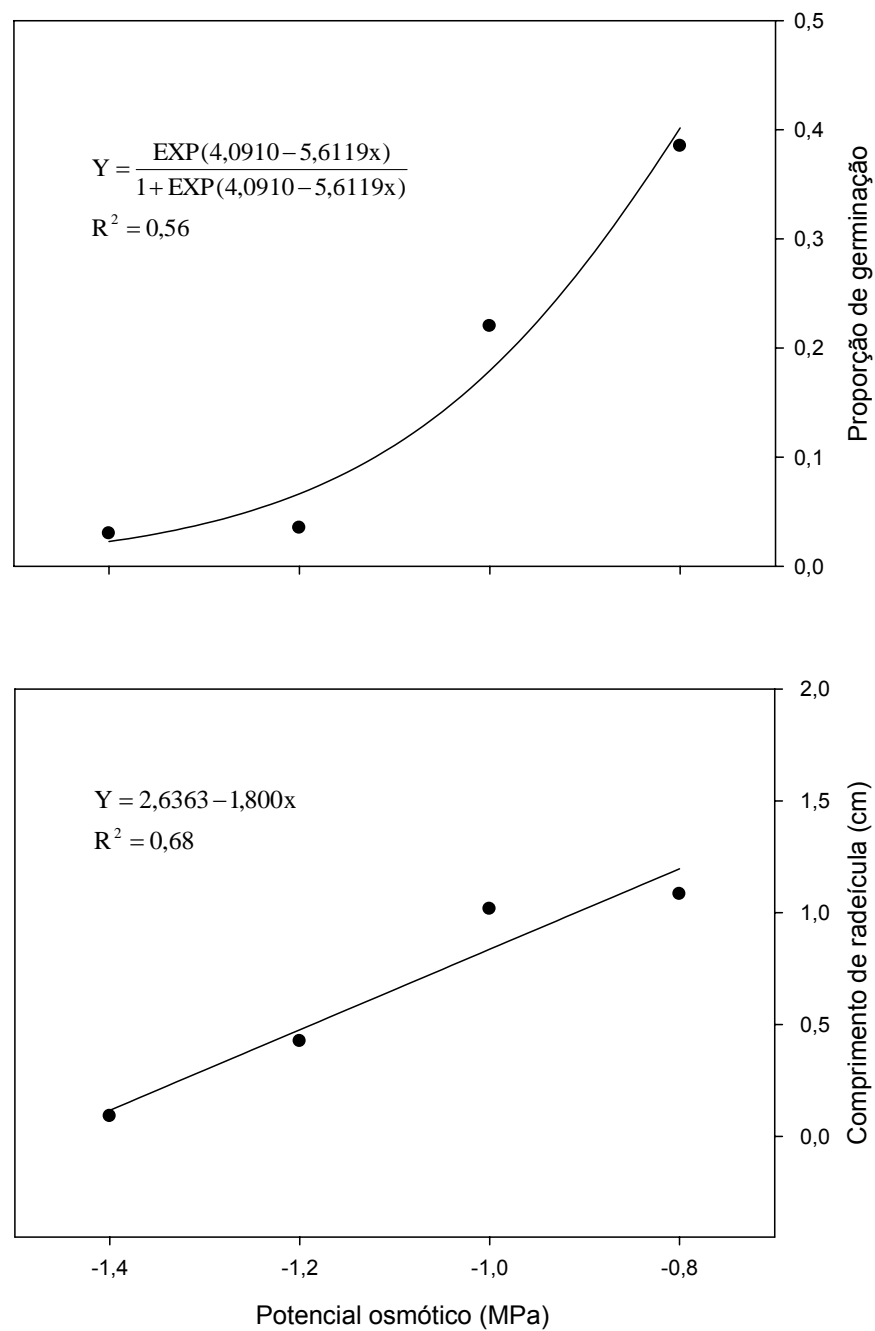
### **4.1 Germinação de sementes e comprimento de radícula de plântulas de girassol submetidas a testes de sanidade padrão e com restrição hídrica**

Em todos os lotes testados, foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos tanto para porcentagem de germinação quanto para comprimento de radícula. O tratamento testemunha (incubação em papel de filtro padrão) diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) dos demais tratamentos (incubação com restrição hídrica induzida pela adição de NaCl e manitol em vários potenciais osmóticos). Os valores médios de ambas as variáveis estudadas, nos tratamentos em que se utilizaram os solutos nos vários potenciais osmóticos, foram inferiores quando comparados ao tratamento testemunha, cujas médias foram 92, 91 e 86%, para porcentagem de germinação, e 2,7, 3,9 e 3,2 cm de comprimento de radícula, respectivamente, para os lotes 1, 2 e 3. À medida que decresceram os níveis de potenciais osmóticos, houve redução da germinação das sementes e do comprimento de radícula (Figuras 1, 2, 3 e 4). O fator soluto foi significativo ( $P < 0,05$ ) apenas para o lote 2. Neste lote, houve menor germinação nos tratamentos em que se utilizou manitol, entretanto, o comprimento de radícula foi menor nos tratamentos em que foi utilizado NaCl. Em todos os lotes estudados, a interação solutos x potenciais osmóticos não foi significativa ( $P < 0,05$ ).

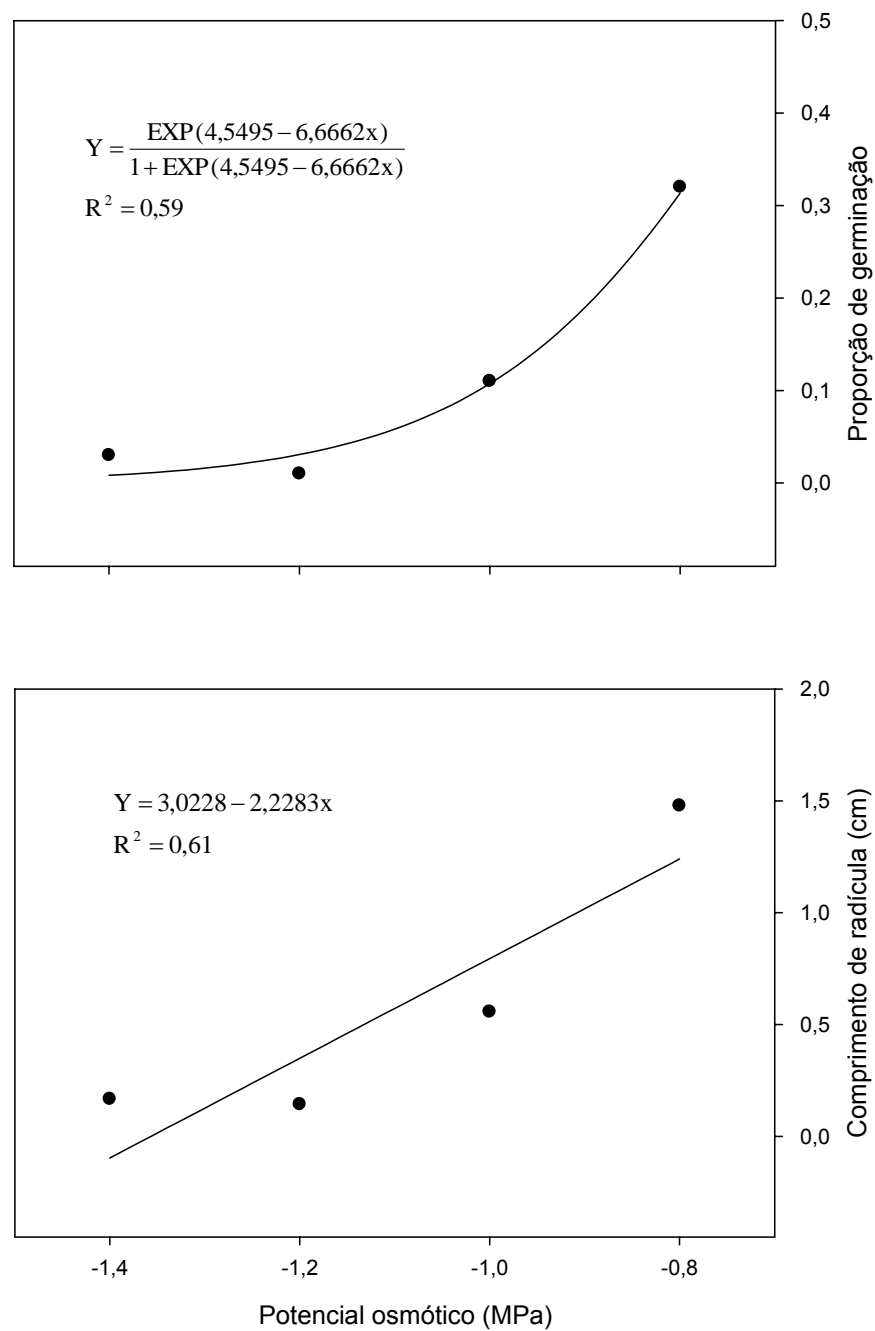




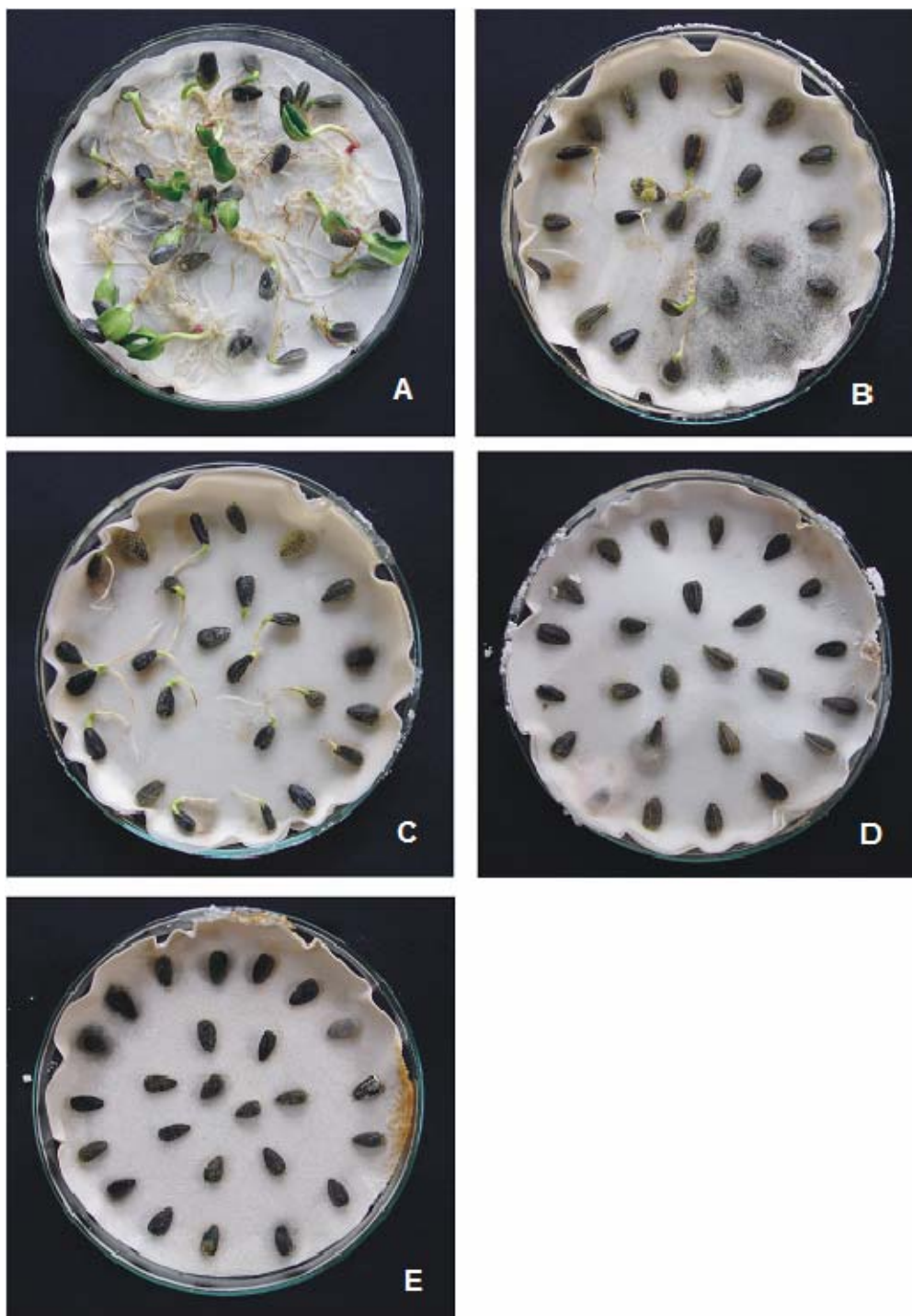
**FIGURA 1.** Germinação e comprimento de radícula (cm) de sementes de girassol (lote 1) submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos.



**FIGURA 2.** Germinação e comprimento de radícula (cm) de sementes de girassol (lote 2) submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos.



**FIGURA 3.** Germinação e comprimento de radícula (cm) de sementes de girassol (lote 3) submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos.



**FIGURA 4.** Sementes de girassol submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha A) e papel de filtro com restrição hídrica (manitol) nos potenciais osmóticos: -0,8 MPa (B), -1,0 MPa (C), -1,2 MPa (D) e -1,4 MPa (E).

*Fotos Wirton Macedo Coutinho*

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os obtidos por Machado et al. (2008), que constataram o efeito inibidor de soluções osmóticas de NaCl, KCl e manitol, utilizadas para embeber o papel de filtro utilizado no teste de sanidade, sobre a germinação e a emissão da radícula de sementes de arroz e de feijoeiro. Resultados semelhantes também foram obtidos por Machado et al. (2007), com sementes de algodoeiro submetidas a testes de sanidade em papel de filtro com restrição hídrica. Esses autores verificaram redução na porcentagem de germinação e no comprimento de plântulas, à medida que decresceram os níveis de potencial osmótico de soluções preparadas com manitol e NaCl utilizadas para induzir a restrição hídrica no substrato.

O prolongamento das fases que antecedem a germinação de sementes em substratos osmoticamente modificados com solutos iônicos e não iônicos tem sido atribuído à diminuição do metabolismo das sementes em função da menor disponibilidade de água para digestão das reservas e translocação dos produtos metabolizados. O estresse hídrico inibe o processo de alongamento celular e síntese de parede, afetando a velocidade e reduzindo a germinação (Bewley e Black, 1994; Taiz e Zeiger, 2004). Os baixos potenciais hídricos das soluções, que são utilizadas para umedecer o substrato, provocam redução na germinação devido à diminuição da quantidade de água absorvida pelas sementes (Wenkert et al., 1978; Adegbuyi et al., 1981). Ainda segundo esses autores, para cada espécie existe um valor de potencial hídrico abaixo do qual a germinação não ocorre.

Além do efeito osmótico, alguns autores atribuem a redução da germinação e do vigor das sementes submetidas ao estresse hídrico aos efeitos tóxicos dos solutos utilizados. Solutos como manitol e NaCl interferem na germinação de sementes tanto pelo efeito osmótico quanto pela penetração em níveis tóxicos nas células (Prisco e O'leary, 1970; Van Der Moezel e Bell, 1987; Braccini et al., 1996). Campos e Assunção (1990), entretanto, atribuíram o fato a uma aparente inibição da síntese e/ou atividade de enzimas hidrolíticas necessárias à germinação das sementes, provocada pelos sais em altas concentrações.

As diferenças entre os solutos utilizados, em relação à eficácia em inibir ou retardar a germinação das sementes, verificadas neste estudo, no lote 2, podem estar relacionadas, além das diferenças de toxidez desses solutos, às diferenças de potencial hídrico de equilíbrio, específico entre a semente e o meio externo, que, segundo Heydecker et al. (1975) e Bradford (1986), podem variar amplamente em função das características das sementes de cada espécie e cultivar e, possivelmente, entre lotes de uma mesma cultivar.

#### **4.2 Incidência de fungos associados a sementes de girassol submetidas a testes de sanidade padrão e com restrição hídrica**

Os resultados referentes à incidência de fungos detectados no lotes de sementes de girassol pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão e papel de filtro com restrição hídrica induzida por NaCl e manitol, em diferentes potenciais osmóticos, estão na Tabela 3. Foram detectados os fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* Link, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries, *Penicillium* spp, *Aspergillus ochraceus* K. Wilh e *Aspergillus glaucus* Link, associados às sementes de girassol.

No lote 1, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios do tratamento-testemunha (incubação em papel de filtro padrão) e os demais tratamentos (métodos de incubação com restrição hídrica induzido pela adição de NaCl e manitol em vários potenciais osmóticos), assim como não foram verificadas diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) com relação aos demais fatores estudados, ou seja, os solutos, os potenciais osmóticos e a interação entre solutos e potenciais osmóticos. Neste lote, o método de incubação com restrição hídrica não afetou a porcentagem de detecção da micoflora associada às sementes.

**TABELA 3.** Incidência (%) de fungos em três lotes de sementes de girassol submetidos ao teste de sanidade pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão - *blotter test* (testemunha) e incubação em papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos. Campina Grande, PB, 2007.

Lote	Fungo	Testemunha	Restrição Hídrica										
			NaCl (MPa)					Manitol (MPa)					
			-0,8	-1,0	-1,2	-1,4	Média (%)	-0,8	-1,0	-1,2	-1,4	Média (%)	
1	<i>Alternaria alternata</i>	32,0	48,0	40,0	45,0	48,0	45,2	31,0	49,0	54,0	34,0	42,0	A
	<i>Aspergillus flavus</i>	91,0	90,0	92,0	95,0	88,0	91,2	92,0	92,0	93,0	90,0	92,0	
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	54,0	A 72,0	80,0	80,0	68,0	75,0	A 64,0	69,0	66,0	68,0	66,7	
	<i>Botrytis cinerea</i>	08,0	11,0	14,0	10,0	08,0	10,7	11,0	13,0	07,0	10,0	41,0	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	02,0	04,0	03,0	02,0	05,0	03,5	03,0	03,0	04,0	05,0	03,7	
	<i>Penicillium spp.</i>	08,0	11,0	08,0	13,0	12,0	11,0	13,0	17,0	15,0	32,0	19,2	
2	<i>Alternaria alternata</i>	90,0	97,0	96,0	95,0	91,0	94,7	91,0	93,0	93,0	86,0	90,7	A
	<i>Aspergillus flavus</i>	04,0	B 07,0	12,0	13,0	07,0	09,7	B 21,0	21,0	18,0	13,0	18,2	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	09,0	20,0	24,0	15,0	22,0	20,2	24,0	31,0	24,0	40,0	29,7	
3	<i>Alternaria alternata</i>	27,0	41,3	48,0	49,0	44,0	45,6	50,0	40,0	61,3	56,0	51,8	A
	<i>Aspergillus flavus</i>	69,0	81,3	95,0	88,0	79,0	85,8	79,0	89,0	85,3	96,0	87,3	
	<i>Aspergillus glaucus</i>	06,0	B 05,3	09,0	07,0	07,0	07,1	A 03,0	02,0	02,7	04,0	03,0	
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	38,0	44,0	54,0	61,0	48,0	51,7	47,0	48,0	44,0	52,0	47,8	
	<i>Botrytis cinerea</i>	02,0	06,7	07,0	08,0	05,0	06,7	01,0	06,0	05,3	04,0	04,0	

Vetores com a mesma letra na linha, por lote, não diferem estatisticamente entre si – Aproximação de F (P < 0,05).

Nos lotes 2 e 3, não foram verificados efeitos significativos ( $P < 0,05$ ) de potenciais osmóticos e da interação entre solutos e potenciais osmóticos; entretanto, o contraste entre o tratamento-testemunha e a média dos demais foi significativa ( $P < 0,05$ ).

No lote 2, verificou-se efeito significativo ( $P < 0,05$ ) do fator soluto, sendo detectada maior incidência de fungos associados às sementes submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica induzida por manitol, quando comparado com o método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica induzida por NaCl. Neste lote, a incubação em papel de filtro com restrição hídrica induzida por NaCl não diferiu estatisticamente do tratamento-testemunha.

No lote 3, foi detectada maior incidência de fungos associados às sementes submetidas aos testes de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, induzida tanto por NaCl quanto por manitol, quando comparado com o tratamento-testemunha (Tabela 3).

Machado et al. (2003), em trabalho com sementes de soja, utilizando como restritores hídricos manitol, KCl e NaCl, verificaram ausência de diferenças marcantes entre os diferentes tipos de restritores hídricos e potenciais utilizados, quando comparados aos do método de 2,4 D e ao método de incubação em papel de filtro padrão. Em outro estudo, Machado et al. (2008) não constataram diferenças estatísticas significativas na detecção de fungos de sementes de arroz e feijoeiro submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica induzida por NaCl, KCl e manitol em diferentes potenciais osmóticos, quando comparado com o teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão.

Neste estudo, entretanto, verificou-se, em dois dos três lotes avaliados, maior incidência de fungos nas sementes submetidas ao teste de sanidade nos métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica.

O fato de a maioria dos fungos associados às sementes de girassol nos lotes estudados ser constituída por fungos classificados artificialmente como “fungos de armazenamento” - ou seja, aqueles que se desenvolvem



melhor em condições de menor umidade nas sementes -, pode ter influenciado o melhor desempenho do método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica induzida pelos solutos testados; além disso, um dos solutos testados, o manitol, é um açúcar simples, que pode ser utilizado como fonte de energia por esses fungos.

Outro aspecto - que deve ser levado em consideração para as diferenças observadas na detecção dos fungos associados às sementes de girassol nos métodos de detecção de patógenos estudados neste trabalho -, é o fato de que, ao contrário do método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica induzida por NaCl e manitol em diferentes potenciais osmóticos, no método de incubação em papel de filtro padrão ocorre a rápida germinação das sementes, durante o período de incubação, o que dificulta a visualização e a identificação dos fungos associados às sementes, podendo afetar de forma significativa a contagem da microflora associada às sementes.

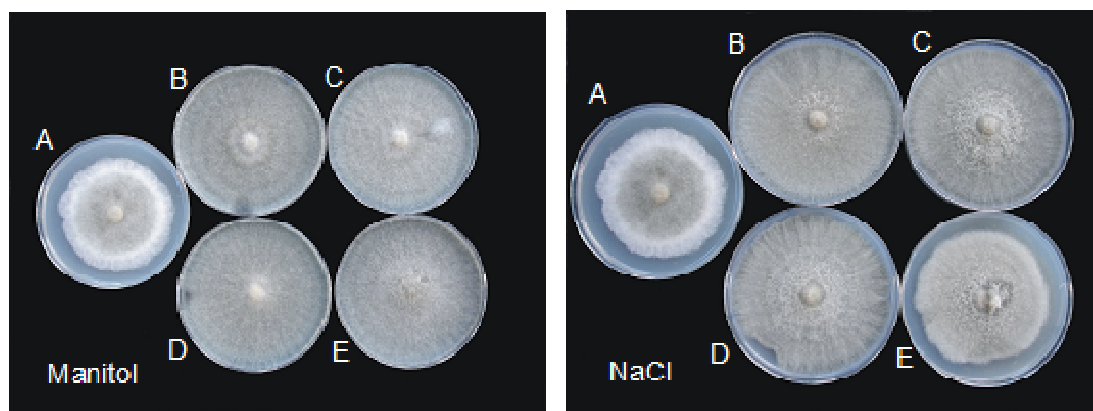
Constatou-se, neste estudo, que a técnica de restrição hídrica, induzida pela adição de NaCl e manitol ao substrato, pode ser uma alternativa utilizada na inibição ou retardamento da germinação de sementes de girassol, em testes de sanidade realizados pelos métodos de incubação em papel de filtro.

A incubação em papel de filtro com restrição hídrica tem algumas vantagens quando comparada a outros métodos, utilizados para inibir a germinação e comprimento de radícula em outras culturas. Por exemplo, a técnica de restrição hídrica, além de ter um custo menor, quando comparada ao uso do 2,4-D, evita o uso desse produto que é carcinogênico e que, dependendo da concentração utilizada, pode também ser tóxico aos patógenos associados às sementes submetidas aos testes de sanidade (Limonard, 1968). Comparada ao método de incubação por congelamento, a restrição hídrica tem a vantagem de não matar as sementes, minimizando as contaminações secundárias, resultantes do crescimento fúngico sobre os nutrientes exsudados das sementes mortas, que são drenados pelo papel de filtro. O uso da técnica de restrição hídrica também dispensa antibióticos,

utilizados para evitar contaminações por bactérias saprofitas, associadas às sementes, que, muitas vezes, inviabilizam o teste economicamente.

#### 4.3 Crescimento micelial de fungos do gênero *Alternaria* que se associam às sementes de girassol em meio de cultura com restrição hídrica

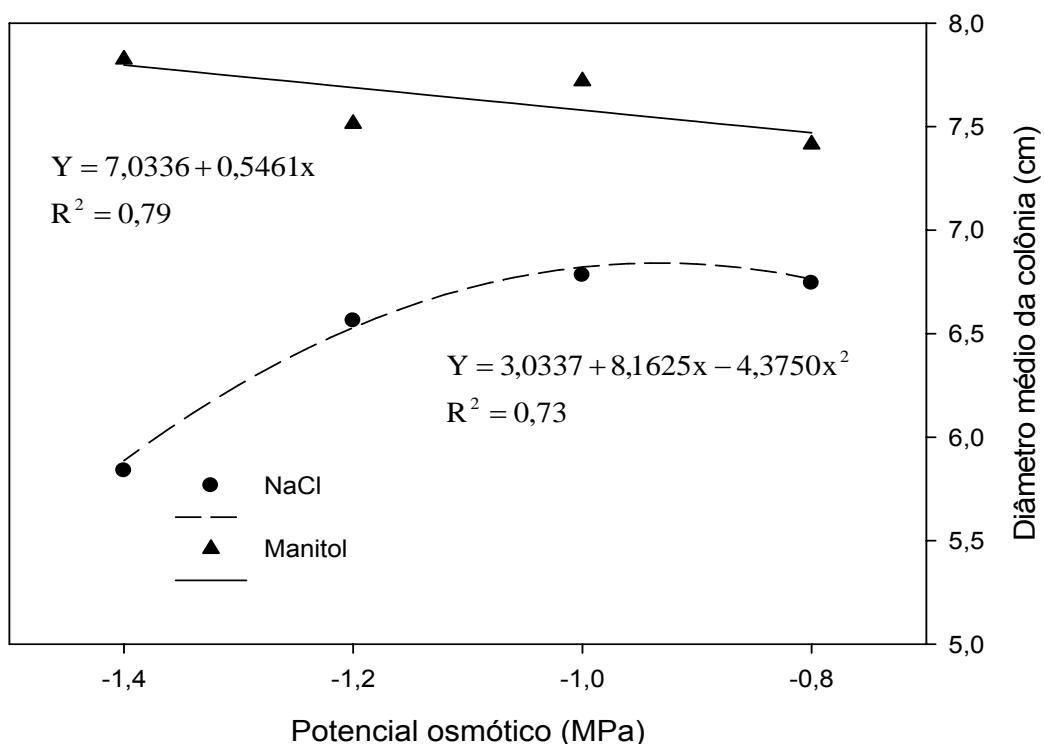
Os resultados referentes ao crescimento micelial de *A. alternata* e *A. zinniae*, após cinco dias de incubação em meio BDA ajustado osmoticamente, em diferentes potenciais, são apresentados nas Figuras 5, 6, 7, 8 e 9. Tanto para *A. alternata* quanto para *A. zinniae*, foram verificadas diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os contrastes testemunhas vs fatorial e testemunha 1 vs testemunha 2, evidenciando diferenças de crescimento micelial entre os isolados 1 e 2, de ambas espécies fúngicas testadas em meio BDA padrão, e destes, com os tratamentos em que foram utilizados manitol e NaCl.



**FIGURA 5.** Crescimento micelial de *A. alternata* em meio BDA (A) e em BDA modificado osmoticamente em diferentes potenciais -0,8 MPa (B); -1,0 MPa (C); -1,2 MPa (D) e -1,4 MPa (E).

*Fotos Wirton Macedo Coutinho*

Para *A. alternata*, houve efeito significativo da interação solutos x potenciais osmóticos. Houve um aumento do crescimento micelial desse fungo nos potenciais osmóticos testados, quando foi utilizado manitol; na medida em que se aumentou o nível de restrição, houve redução do crescimento micelial nos tratamentos em que foi utilizado NaCl (Figura 6).

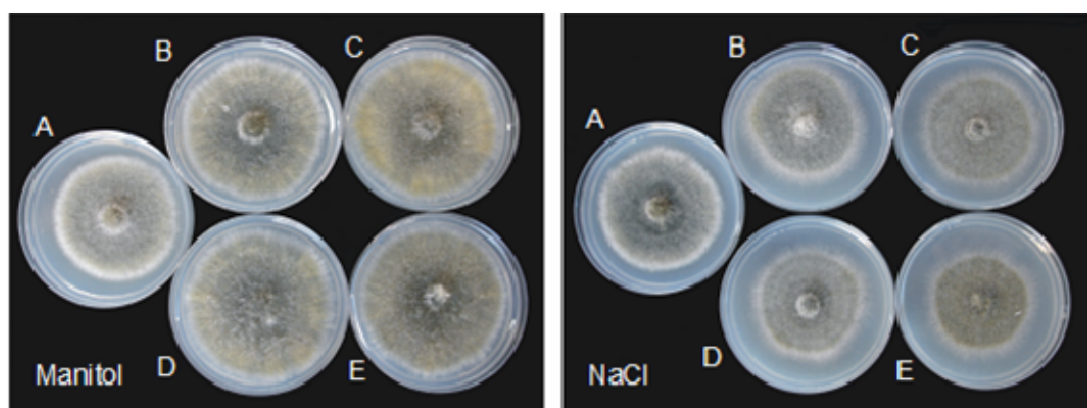


**FIGURA 6.** Diâmetro médio da colônia de *A. alternata* em meio BDA modificado osmoticamente com NaCl e manitol em diferentes potenciais osmóticos.

Apesar dos valores de crescimento micelial no meio de cultura ajustado com NaCl serem inferiores aos observados nos tratamentos em que se utilizou BDA osmoticamente modificado com manitol, o crescimento micelial de *A. alternata* no meio de cultura ajustado osmoticamente com esse sal, nos diferentes potenciais osmóticos testados, foi superior aos valores observados nos tratamentos-testemunhas (BDA padrão), cujos valores foram 5,9 e 4,8 cm, respectivamente, para os isolados 1 e 2.

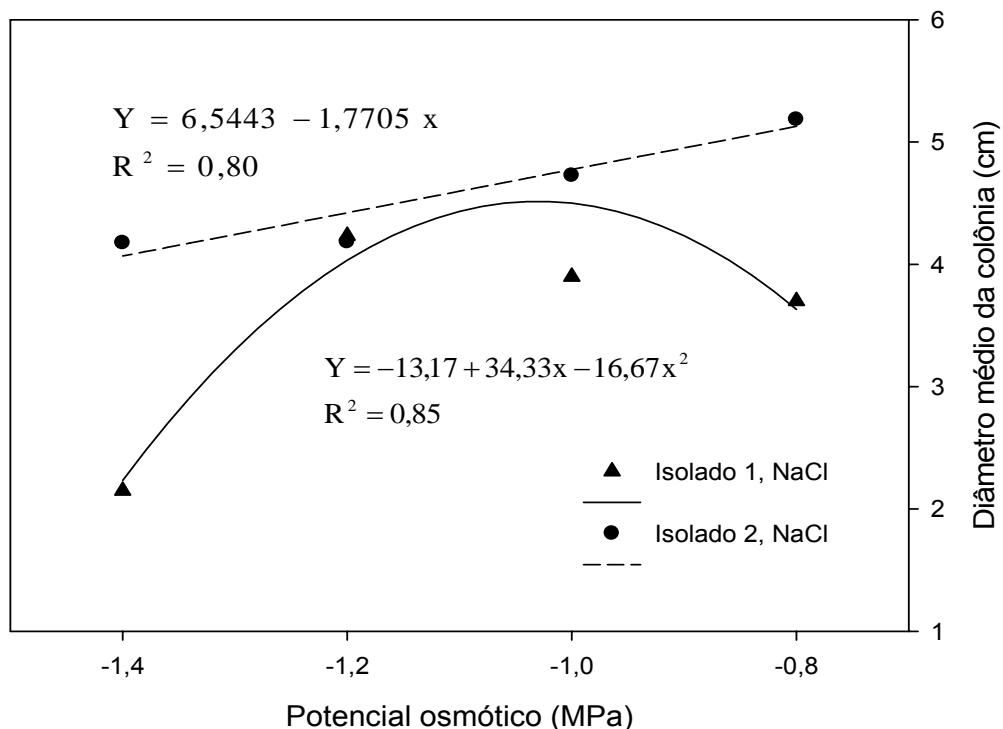
Para *A. zinniae*, constatou-se o efeito significativo ( $P < 0,05$ ) da interação isolados x solutos x potenciais osmóticos. Pelo desdobramento dessa interação, verificaram-se diferenças significativas com relação ao crescimento micelial dos dois isolados avaliados no meio de cultura modificado osmoticamente com os dois solutos NaCl e manitol.

Os valores de crescimento micelial dos dois isolados crescidos no meio de cultura ajustado osmoticamente com NaCl, nos diferentes potenciais osmóticos (Figuras 7 e 8), foram inferiores aos tratamentos testemunhas, cujos valores de crescimento micelial foram 5,8 e 4,9 cm, respectivamente, para os isolados 1 e 2, evidenciando o efeito negativo desse sal no crescimento micelial de *A. zinniae*. Para esse soluto, à medida que decresceram os níveis de potenciais osmóticos, houve redução do crescimento micelial do fungo (Figura 8).



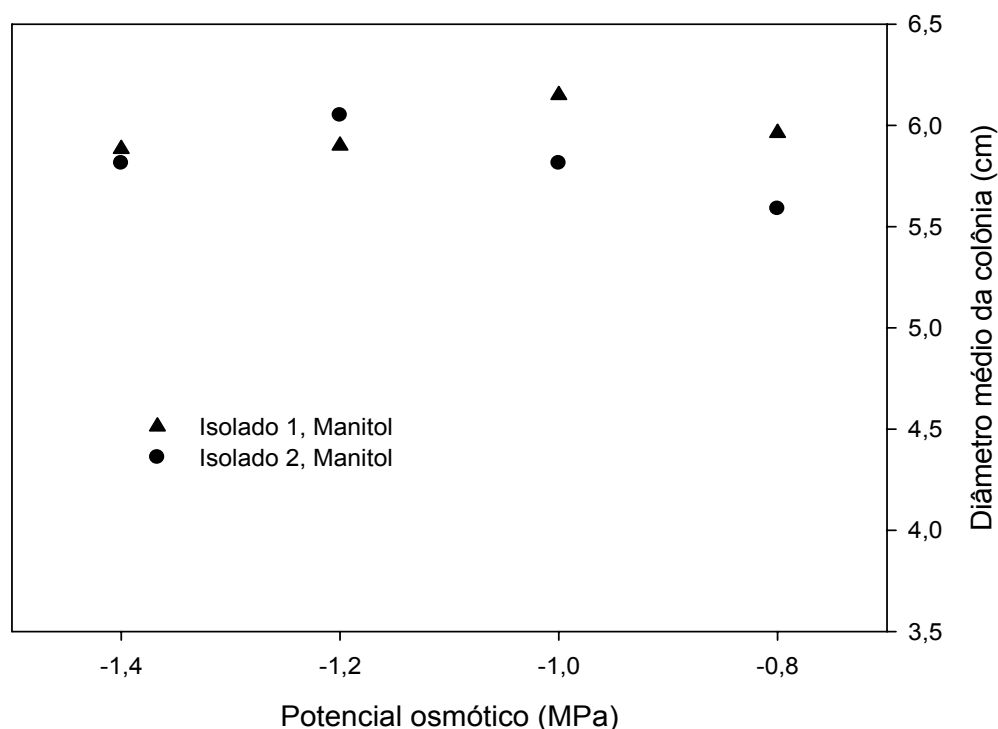
**FIGURA 7.** Crescimento micelial de *A. zinniae* em meio BDA (A) e em BDA modificado osmoticamente em diferentes potenciais -0,8 MPa (B); -1,0 MPa (C); -1,2 MPa (D) e -1,4 MPa (E).

*Fotos Wirton Macedo Coutinho*



**FIGURA 8.** Diâmetro médio da colônia de *A. zinniae* em meio BDA modificado osmoticamente com NaCl em diferentes potenciais osmóticos.

Ao contrário de NaCl, nos tratamentos em que se utilizou manitol, o diâmetro médio das colônias foi estimulado positivamente pelo aumento do potencial osmótico do meio de cultura (Figura 9), superando os valores observados nos tratamentos testemunhas (BDA padrão) e nos tratamentos com NaCl como soluto osmótico, nos diferentes níveis testados, para ambos os isolados. Para esse soluto não foram verificados efeitos significativos de potenciais osmóticos.



**FIGURA 9.** Diâmetro médio da colônia de *A. zinniae* em meio BDA modificado osmoticamente com manitol em diferentes potenciais osmóticos.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os obtidos em diversos trabalhos que evidenciam o efeito estimulador da adição de solutos, principalmente aqueles utilizados como fonte adicional de açúcar, no crescimento micelial *in vitro* de fungos (Carvalho et al., 2001; Farias et al., 2004; Teixeira et al., 2005; Machado, 2008). Nesses trabalhos, de uma maneira geral, foi constatado que o crescimento fúngico é estimulado até um determinado nível, declinando sob potenciais osmóticos mais negativos, normalmente acima de -1,0 MPa.

As diferenças detectadas em relação ao crescimento micelial de *A. alternata* e *A. zinniae*, cultivadas em meio modificado osmoticamente, têm sido relatadas para vários outros fungos (Adebayo e Harris, 1971; Wearing e Burgess, 1979; Subbarao et al, 1993; Gao e Shain, 1995; Alam et al., 1996; Whiting e Rizzo, 1999). Essas diferenças podem estar relacionadas aos

efeitos combinados de permeabilidade seletiva de membranas e compatibilidade ou toxidez de solutos, tanto externamente quanto internamente à membrana celular.

O crescimento micelial de fungos em meios de cultura ajustados osmoticamente é variável para cada espécie (Duniway, 1979). O maior crescimento micelial de alguns desses fungos em meio de cultura ajustado osmoticamente com manitol pode estar também relacionado à utilização desse açúcar como fonte adicional de energia. Gao e Shain (1995) constataram um maior crescimento micelial de *Cryphonectria parasitica* em meio de cultura ajustado osmoticamente com sacarose do que em meios de cultura ajustados com NaCl, KCl e a mistura dos sais NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5:3:2) em potenciais osmóticos semelhantes. Além da utilização da sacarose como fonte adicional de energia pelo fungo, esses autores atribuíram o crescimento diferenciado de *C. parasitica* aos efeitos tóxicos dos sais utilizados, principalmente em potenciais osmóticos mais negativos.

Alam et al. (1996) também constataram os efeitos tóxicos dos sais NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, utilizados isoladamente ou em mistura, para ajustar o potencial osmótico de meios de cultura utilizados no crescimento dos fungos *A. alternata* e *Botrytis cinerea*.

Neste estudo, o crescimento micelial *in vitro* dos isolados de *A. alternata* não foi reduzido pela utilização de NaCl (Figuras 5 e 6), mas estimulado em alguns potenciais osmóticos. Uma hipótese acerca do efeito estimulador no crescimento fúngico até determinado potencial osmótico negativo está associada à melhor absorção de solutos e ao melhor ajuste osmótico das células fúngicas, proporcionando maior turgor para extensão celular (Alam et al., 1996; Machado et al., 2008). Porém, para isolados de *A. zinniae*, o crescimento micelial foi reduzido pela utilização de NaCl em comparação ao tratamento testemunha, o que pode estar relacionado a um possível efeito tóxico desse sal no crescimento desse fungo.

Avaliando o manitol como soluto para o ajuste osmótico do meio nos diferentes potenciais osmóticos, o maior crescimento dos dois isolados de ambas as espécies de *Alternaria* (Figuras 5, 6, 7 e 9), quando comparado

com o crescimento dos tratamentos-testemunhas (BDA padrão), pode estar relacionado à utilização desse soluto como fonte adicional de energia por esses fungos.



## 5 CONCLUSÕES

A restrição hídrica induzida por NaCl e manitol, nos potenciais osmóticos -0,8 MPa, -1,0 MPa, -1,2, MPa e -1,4 MPa, inibe ou retarda a germinação e o comprimento de radículas de sementes de girassol. Estes mesmos potenciais não interferem na detecção dos fungos associados às sementes ou plântulas na análise sanitária de sementes pelo método de incubação em papel de filtro;

A restrição hídrica do meio BDA, induzida por manitol nos diferentes potenciais osmóticos -0,8 MPa, -1,0 MPa, -1,2, MPa e -1,4 MPa, estimula o crescimento micelial *in vitro* de *A. alternata* e *A. zinniae*.

A restrição do meio BDA, induzida por NaCl nos potenciais osmóticos 0,8 MPa, -1,0 MPa, -1,2, MPa e -1,4 MPa, estimula o crescimento micelial *in vitro* de *A. alternata* e afeta de forma negativa o crescimento micelial de *A. zinniae*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, A.A.; HARRIS, R.F. Fungal growth responses to osmotic as compared to matric water potential. **Soil Science America Proceedings**, Madison, v.35, n.3, p.465-469, May/June 1971.

ADEGBUYI, E.; COOPER, S.R.; DON, R. Osmotic priming of some erbage grass seed using polyethylene glycol (PEG). **Seed Science and Technology**, Zürich, v.9, n.3, p.867-878, 1981.

ALAM, S., JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on *in vitro* growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v.36, p.383-388, 1996.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed.. Mineapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York. Plenum Press. 1994. 445p.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BROWNELL, K.H.; SCHENEIDER, R.W. Roles of matric and osmotic components of water potential and their interaction with temperature in the growth of *Fusarium oxysporum* in synthetic media and soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, n.1, p.53-57, Jan. 1985.

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

CARVALHO, J.C.B.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C. Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.4, p.999-1005, jul./ago., 2001.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 588p.

CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G. e BORGHETTI, F. (Orgs). **Geminação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 149-162, 2004.

CASTRO, C.; CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A.; et al. **A cultura do girassol**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 1997. 36p. (circular técnica).

COSTA, C.J.; VILLELA, F.A. Condicionamento osmótico de sementes de beterraba. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.28, n.1, p.21-29, 2006.

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

COOK, R.J.; PAPENDICK, R.I. Influence of water potential of soils and 3555 plants on root disease. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.10, p.349- 374, 1972.

COOK, J.R.; PAPENDICK, R.I. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease, with special reference to postharvest pathology. **HortScience**, Alexandria, v.13, n.5, p.559-564, Oct. 1978.

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

DUNIWAY, J.M. Water relations of water molds. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, n.1, p.431-467, 1979.

EIRA, M.T.S.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento osmótico de sementes de alface: desempenho sob estresses hídrico, salino e térmico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.12, n.1, p.28-45, 1990a.

EIRA, M.T.S.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento osmótico de sementes de alface: efeitos sobre a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.12, n.1, p.9-27, 1990b.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**, Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 1971. 608 p.

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

FARIAS, C.R.J.; DEL PONTE, E. M.; CORREA, C. L.; et al. Crescimento radial de *Bipolaris sorokiniana* em resposta à indução de restrição hídrica por solutos osmóticos em meio agarizado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.4, p.457-460, out/dez, 2004.

GAO, S.; SHAIN, L. Effect of osmotic potential on virulent and hypovirulent strains of the chesnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.25, n.6, p.1024-1029, June 1995.

GODOY, J.R.; FERNANDES, N.G. *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki; Nishihara em girassol (*Helianthus annuus* L.): Influência da idade da planta na suscetibilidade e na infecção das sementes. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.11, p.198-214, Jul./Dez., 1985.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? **Seed Science & Technology**, Zürich, v.3, n.3/4, p.881-888, 1975.

HENNING, A.A. **Patologia de sementes**: noções gerais. Londrina: Embrapa Soja, Documento n. 235, 2004. 51p.

KACKLEY, K.E.; GRYBAUSCAS, A.P.; DERNOEDEN, P.H. Growth of *Magnaporthe poae* and *Gaeumannomyces incrustans* as affected by temperature-osmotic potential interactions. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, n.7, p.649-650, July 1990.

LIMONARD, T. Ecological aspects of seed health testing. **Proceedings of International Seed Testing Association**, Wagenigen, v.33, n.3, p.343-513, 1968.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília: Ministério da Educação, ESAL/FAEPE, 1988. 107p.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: Editora UFLA, 2000. 138p.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.88-94, 2001.

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

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

MACHADO, A. Q.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. D.G.G.C.; et al. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.5. p.408-414, 2007.

MACHADO, J.C.; COUTINHO, W.M., GUIMARÃES, R.M.; et al. Use of osmotic solutes to control seed germination of rice and common bean in seed health blotter tests, **Seed Science and Technology**, Zürich, v.36, p.66-75, 2008.

McCULLAGH, P.; NELDER, J.A. **Generalized Linear Models**. 2.ed. New York: Chapman & Hall, 1989. 511p. (Monographs on Statistics and Applied Probability, 37)

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

MARCOS FILHO, J. Germinação de sementes. In: CÍCERO, S. M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R. (ed). **Atualização em produção de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, p. 11-39, 1986.

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

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

PAES, J. M. V. Utilização do girassol em sistemas de cultivo. In: MIRAGAYA, J. C. G.; BELTRÃO, N. E. de, M; TEIXEIRA, L. C.; et al., **Produção de oleaginosas para biodisel**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.26, n.229. p.34-41, 2005.

PILL, W.G. Low water potential and pressing germination treatments to improve seed quality. In: BARSA, A.S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products Press, p. 319-359, 1994.

PRISCO, J.T.; OLEARY, J.W. Osmotic and 'toxic:' effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Turrialba**, San Jose, v.20, n.2, p.177-184, Abr.-Jun., 1970.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

RENCHER, A.C. **Methods of multivariate analysis**. 2. ed. United States of America: John Willey & Sons, 2002. 708p.

SALISBURY, F.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont, California: Wadsworth, 1992. 682p.

SOMMERS, L.E.; HARRIS, R.F.; DALTON, F.N.; et. al. Water potential relations of three root-infecting *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, n.6, p.932-934, 1970.

SUBBARAO, K.V.; MICHAILIDES, T.J.; MORGAN, D.P. Effects of osmotic potential and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.12, p.1454-1459, 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, H., MACHADO J.C., ORIDE, D., et al. Técnica de restrição hídrica: Efeito sobre *Acremonium strictum*, protusão de sementes e obtenção de sementes de milho infestadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.2, p.109-114, 2005.

UNGARO, M.R.G. **Cultura do Girassol**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2000. 36 p. (Boletim Técnico, 188).[

VAN DER MOEZEL, P.G.; BELL, D.T. The effect of salinity on the germination of some Western Australian *Eucalyptus* and *Malaleuca* species. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.15, n.1, p.239-246, 1987.

VILLELA, F.A.; DONI-FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.11/12, p.1957-1968, 1991.

WEARING, A.H.; BURGESS, L.W. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* "graminearum". **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.11, n.6, p.661-667, 1979.

WENKERT, W.; LEMON, E.R.; SINCLAIR, T.R. Leaf elongation and turgor pressure in field; grown soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, n.5, p.761-764, 1978.

WHINTING, E. C.; RIZZO, D. M. Effect of water potential on radial colony growth of *Armillaria mellea* and *A. gallica* isolates in culture. **Mycologia**, California, v.91, n.4, p.627-635, 1999.

WOODS, D. M.; DUNIWAY, J. M. Some effects of water potential on growth, turgor, and respiration of *Phytophthora cryptogea* and *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, n.11, p.1248-1254, nov. 1986.

## 7 ANEXO

**TABELA 1A.** Resumo da análise de deviance dos dados de germinação de três lotes de sementes de girassol submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro – *blotter test* padrão (testemunha) e papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos.

Contraste	V1	V2	Qui-Quadrado		
			Lote 1	Lote 2	Lote 3
Testemunha vs. Fatorial	1	24 ‡	46,25 **	196,84 **	85,31 **
Solutos	2	24 ‡	0,02 <sup>ns</sup>	10,03 **	0,89 <sup>ns</sup>
Potenciais osmóticos	3	24 ‡	16,57 **	99,35 **	27,50 **
Solutos x Potenciais osmóticos	3	24 ‡	0,43 <sup>ns</sup>	5,07 <sup>ns</sup>	2,52 <sup>ns</sup>

ns = não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado, \*\* = significativo a 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado, V1 = graus de liberdade do numerador, V2 = graus de liberdade do denominador, ‡ No lote 3, o valor de V2 foi 20



**TABELA 2A.** Resumo da análise de deviance dos dados de comprimento de radícula de três lotes de sementes de girassol submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro – *blotter test* padrão (testemunha) e papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos.

Contraste	V1	V2	Qui-Quadrado		
			Lote 1	Lote 2	Lote 3
Testemunha vs. Fatorial	1	24 ‡	34,39 **	118,32 **	50,74 **
Solutos	2	24 ‡	0,32 <sup>ns</sup>	4,18 **	0,52 <sup>ns</sup>
Potenciais osmóticos	3	24 ‡	19,31 **	17,15 **	13,19 **
Solutos x Potenciais osmóticos	3	24 ‡	0,20 <sup>ns</sup>	4,47 <sup>ns</sup>	0,7741 <sup>ns</sup>

ns = não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado, \*\* = significativo a 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado, V1 = graus de liberdade do numerador, V2 = graus de liberdade do denominador, ‡ No lote 3, o valor de V2 foi 20

**TABELA 3A.** Resumo da análise de variância multivariada dos dados de incidência dos fungos associados às sementes de girassol (lote 1) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro – *blotter test* padrão (testemunha) e papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos.

Fonte de variação	G.L.	Wilks (valor)	V1	V2	Aproximação de F
Testemunha vs. Fatorial	1	0,63962162	6	19	1,78 ns
Solutos	1	0,6775165	6	19	1,51 ns
Potenciais osmóticos	3	0,5756823	18	54,2	0,65 ns
Solutos x Potenciais osmóticos	3	0,565415	18	54,2	0,67 ns
(Tratamentos)	(8)	(0,16211632)	(48)	(97,5)	(0,91) ns
Erro	24				

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade  
V1 = graus de liberdade do numerador  
V2 = graus de liberdade do denominador

**TABELA 4A.** Resumo da análise de variância multivariada dos dados de incidência dos fungos associados às sementes de girassol (lote 2) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro – *blotter test* padrão (testemunha) e papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos.

Fonte de variação	G.L.	Wilks (valor)	V1	V2	Aproximação de F
Testemunha vs. Fatorial	1	0,63674586	3	22	4,18*
Solutos	1	0,5057982	3	22	7,16**
Potenciais osmóticos	3	0,5378326	9	53,7	1,73 ns
Solutos x Potenciais osmóticos	3	0,8391925	9	53,7	0,44 ns
(Tratamentos)	(8)	(0,19128806)	(24)	(64,4)	2,06*
Erro	24				

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade,

\* = significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

\*\* = significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

V1 = graus de liberdade do numerador

V2 = graus de liberdade do denominador

**TABELA 5A.** Resumo da análise de variância multivariada dos dados de incidência dos fungos associados às sementes de girassol (lote 3) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro – *blotter test* padrão (testemunha) e papel de filtro com restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos.

Fonte de variação	G.L.	Wilks (valor)	V1	V2	Aproximação de F
Testemunha vs. Fatorial	1	0,31703408	5	16	6,89**
Solutos	1	0,6087946	5	16	2,05 ns
Potenciais osmóticos	3	0,3834839	15	44,6	1,23 ns
Solutos x Potenciais osmóticos	3	0,2993996	15	44,6	1,63 ns
(Tratamentos)	(8)	(0,04219494)	(40)	(72,5)	(1,94) ns
Erro	20				

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

\*\* = significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

V1 = graus de liberdade do numerador

V2 = graus de liberdade do denominador

**TABELA 6A.** Resumo da análise de deviance dos dados de crescimento micelial (quinto dia) de *A. alternata* e *A. zinniae* em meio BDA (testemunha) e em meio BDA modificado osmoticamente com NaCl e manitol em diferentes potenciais osmóticos.

Contraste	V1	V2 <sup>‡</sup>	Qui-Quadrado	
			<i>A. alternata</i>	<i>A. zinniae</i>
Testemunhas vs. Fatorial	1		102,92**	19,20**
Testemunha 1 vs Testemunha 2	1		26,60**	18,58**
Solutos	1		93,77**	160,24**
Isolados	1		35,60**	31,04**
Potenciais osmóticos	3		9,74*	47,49**
Solutos x Potenciais osmóticos	3		35,49**	31,57**
Solutos x Isolados	1		2,35 <sup>ns</sup>	54,43**
Isolados x Potenciais osmóticos	3		0,91 <sup>ns</sup>	27,73**
Isolados x Solutos x Potenciais osmóticos	3		1,34 <sup>ns</sup>	30,02**

ns = não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado, \*\* = significativo a 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado, V1 = graus de liberdade do numerador, V2 = graus de liberdade do denominador, <sup>‡</sup> Para *A. alternata* e *A. zinniae*, o valor de V2 foi, respectivamente, 49 e 45.

**ANEXO B**

Meio BDA (extrato de batata-dextrose-ágar)

Batata descascada.....	200g
Dextrose.....	20g
Agar.....	20g
Água destilada.....	1000mL

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)