

**ASPECTOS DA INTERAÇÃO DE FUNGOS
PATOGENICOS E SEMENTES, SOB CONDIÇÕES
DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

CARLA LIMA CORRÊA

2009

CARLA LIMA CORRÊA

**ASPECTOS DA INTERAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS E
SEMENTES, SOB CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Corrêa, Carla Lima.

Aspectos da interação fungos patogênicos e sementes, sob condições de restrição hídrica / Carla Lima Corrêa. – Lavras : UFLA, 2009.

68 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Soja. 3. *Stenocarpella maydis*. 4. *Colletotrichum truncatum*. 5. Embebição. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.4

CARLA LIMA CORRÊA

**ASPECTOS DA INTERAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS E
SEMENTES, SOB CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 13 de Agosto de 2009

Pesq. Dra. Cibele Ferreira Machado	Dow AgroSciences
Prof. Dra. Maria das Graças G. C. Vieira	UFLA
Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2009

*Aos meus pais Carlos e Lenir, e ao meu irmão Matheus
Pelo amor dedicado a mim, o carinho, a paciência, pela confiança depositada, a
compreensão pelos dias em que estive ausente.*

*Ao Eder
Pelo companheirismo e cumplicidade, por ter compartilhado comigo os ideais,
incentivando-me a prosseguir mesmo nas horas em que estes pareciam distantes
e inatingíveis, nada seria possível sem teu apoio, carinho, dedicação e,
principalmente, teu amor.*

DEDICO

*Ao meu orientador, Prof. Dr. José da Cruz Machado
Pela coordenação deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos e,
principalmente, sua amizade.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais *Carlos* e *Lenir*, ao meu irmão *Matheus*, pelo amor, incentivo e cumplicidade.

Ao *Eder*, pelo amor, carinho e dedicação e, também, por não ter medido esforços para ajudar-me na condução dos experimentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Dr. *José da Cruz Machado* e co-orientador Dr. *Renato Mendes Guimarães*, pela valiosa orientação, ensinamentos e amizade, contribuindo com a minha formação profissional.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos durante o curso e, aos funcionários, colegas e amigos, pela amizade e disponibilidade sempre que necessário.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes: *Luana, Ellen, Carol, Vivi, Janaina, Mirella, Rodrigo, Maria Luiza, Maria Eloisa (Biotita), Ângela, Elenice, Pepe, Luiz, Tião, Ivan, Chicão, Neto, Claudio*, pela amizade, pelo carinho e disponibilidade de ajuda sempre. Em especial, ao bolsista de iniciação científica, *Gustavo*, pela amizade, presença constante e ajuda fundamental durante a realização dos trabalhos.

Aos professores, funcionários, colegas e amigos do Departamento de Agricultura (Setor de Sementes), em especial à *Priscila*, pela amizade e ajuda na condução dos trabalhos realizados no setor.

À banca examinadora: professora *Maria das Graças Carvalho Vieira*, professor *Ricardo Magela de Souza* e professor *Renato Mendes Guimarães* pela

disponibilidade e valiosas sugestões e, em especial, a pesquisadora Dra. *Cibele Ferreira Machado*, pela valiosa contribuição na elaboração deste trabalho.

À empresa Pioneer Sementes, em especial ao funcionário *André Aguirre* e, à Fazenda Arco-Íris, em especial à *Patrícia Trentini*, pelo fornecimento de sementes para realização deste trabalho.

Em especial aos amigos *Juliano* e *Ilisandra*, que juntos, em 2006, aceitamos o desafio de cursar o Doutorado em Lavras. A amizade de vocês, o carinho, a cumplicidade e o companheirismo foram essenciais para os bons momentos vividos aqui.

Ao *Bernardo*, meu “Bassezinho” por toda alegria que proporciona, pelo amor e amizade incondicional, sem esperar algo em troca.

Aos demais familiares e amigos pela força, apoio e incentivo.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRAT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Padrão de embebição de sementes sob condições de restrição hídrica.....	3
2.2 Restrição hídrica nas relações entre sementes e microrganismos.....	5
2.3 Sistemas enzimáticos na determinação da qualidade fisiológica de sementes submetidas à restrição hídrica.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Estabelecimento das curvas de embebição de sementes de milho e soja, na presença e ausência de <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i> , respectivamente, em substrato com diferentes restritores e potenciais hídricos..	13
3.2 Avaliação do desempenho das sementes de milho e soja submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência dos fungos <i>S. maydis</i> e <i>C. truncatum</i> ..	14
3.2.1 Teste de sanidade.....	16
3.2.2 Teste de germinação e primeira contagem.....	17
3.2.3 Teste de condutividade elétrica.....	17
3.2.4 Determinação dos padrões eletroforéticos de enzimas.....	18
3.3 Delineamento experimental e análise estatística.....	19
3.3.1 Avaliação da germinação e vigor (primeira contagem e condutividade elétrica).....	19
3.3.2 Teste Sanidade.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Estabelecimento da curva de embebição de sementes de milho, submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência do fungo <i>Stenocarpella maydis</i>	20
4.2 Desempenho das sementes de milho submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência do fungo <i>S. maydis</i>	27

4.3 Padrões eletroforéticos de sistemas enzimáticos de sementes de milho, submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência de <i>Stenocarpella maydis</i> .	33
4.4 Estabelecimento da curva de embebição de sementes de soja, submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência do fungo <i>Colletotrichum truncatum</i>	40
4.5 Desempenho das sementes de soja submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência do fungo <i>Colletotrichum truncatum</i>	47
4.6 Padrões eletroforéticos de sistemas enzimáticos de sementes de soja, submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência de <i>Colletotrichum truncatum</i>	50
5 CONCLUSÕES	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	65

RESUMO

CORRÊA, Carla Lima. **Aspectos da interação de fungos patogênicos e sementes, sob condições de restrição hídrica**. 2009. 68p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Em Patologia de Sementes, estudos sobre a interação e efeitos de fungos patogênicos em sementes necessitam de metodologias adequadas que possam caracterizar com mais precisão os eventos que ocorrem neste tipo de interação. Dessa forma, o emprego da técnica de restrição hídrica, ou condicionamento fisiológico, tem se revelado como uma ferramenta importante para esse tipo de estudo, tanto em testes de sanidade de sementes, como em atividades envolvendo inoculação de patógenos. Porém, a referida técnica ainda necessita de alguns estudos adicionais para o seu uso mais extensivo. Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi avaliar a viabilidade do uso da técnica de restrição hídrica em estudos de interação fisiológica e bioquímica de sementes com patógenos, considerando-se aspectos relacionados a padrões de embebição e qualidade de sementes. Foram selecionados para este estudo dois patossistemas: *Stenocarpella maydis* e sementes de milho e *Colletotrichum truncatum* e sementes de soja. Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia e nos Laboratórios de Eletroforese e de Análise de Sementes, do Departamento de Agricultura, ambos da Universidade Federal de Lavras - MG. Para estabelecer o padrão de embebição de sementes de milho e soja, na presença e ausência dos fungos em estudo, as sementes foram expostas às soluções de restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e PEG 6000, em três níveis de potencial hídrico, -0,8, -1,2 e -1,6 MPa. No ensaio conduzido na ausência dos fungos no substrato, além da emissão de radícula, avaliou-se também o período que as sementes atingiram o comprimento radicular igual ou superior à maior dimensão (comprimento) da semente. Para avaliação dos efeitos da restrição hídrica e dos patógenos sobre a qualidade das sementes foi selecionado o potencial hídrico -1,2 MPa para cada soluto. A qualidade das sementes de milho e de soja foi avaliada por meio dos testes de germinação e sanidade, primeira contagem do teste de germinação, condutividade elétrica, além de sistemas enzimáticos. Com base nos resultados, foi evidenciado que a presença de *S. maydis* e *C. truncatum* interferiu no padrão de embebição das sementes de ambas as espécies consideradas. Houve menor absorção de água pelas sementes, além de maior inibição da protrusão radicular, nos potenciais hídricos mais negativos. Dentre os tratamentos de restrição, NaCl

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado – UFLA (Orientador); Renato Mendes Guimarães – UFLA

foi prejudicial à qualidade fisiológica das sementes de milho e soja, reduzindo a germinação e vigor, independente da presença ou não dos fungos. Em relação à inoculação, manitol foi o restritor que mais favoreceu a incidência dos patógenos em estudo, ao contrário de PEG 6000, que proporcionou os menores valores de incidência dos fungos. Os sistemas enzimáticos malato desidrogenase, álcool desidrogenase, catalase e esterase apresentaram alterações em seus padrões eletroforéticos, o que não ocorreu com superóxido dismutase, cujo padrão manteve-se estável para todos os tratamentos de restrição hídrica estudados.

ABSTRAT

CORRÊA, Carla Lima. **Characteristics of the interaction between pathogenic fungi and seeds under water restriction conditions**. 2009. 68p. Thesis (Doctorate in Plant Pathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

In Seed Pathology, studies on the interaction and effect of pathogenic fungi on seeds require adequate methodologies to provide a more accurate characterization of the events occurring in this biological interaction. Therefore, the use of water restriction technique or physiological conditioning has proved to be an important tool either for seed health test or pathogen inoculation. However, the referred technique still needs additional studies before its widespread use. Hence, the objective of this work was to verify the viability of using the water restriction technique to assess the physiological and biochemical aspects derived from the interaction between seeds and pathogens and based on the analysis of imbibition curves and seed quality variables. For these studies, two pathosystems were considered: *Stenocarpella maydis* and maize seeds and *Colletotrichum truncatum* and soybean seeds. The experiments were carried out in the Seed Pathology Laboratory, Department of Plant pathology and the Laboratory of Electrophoresis and Seed Analysis, Department of Agriculture, both at the Federal University of Lavras – MG. In order to understand the imbibition pattern for maize and soybean seeds, in the presence and absence of the mentioned fungi, seeds were exposed to the water restriction solutions induced by mannitol, NaCl and PEG 6000, in three potential levels: -0.8, -1.2 and -1.6 MPa. In the assay conducted in the absence of the fungi on the substrate, the variables considered were: size and time of the radicle elongation. The effects of the water restriction and pathogens on the quality of seeds were evaluated at -1,2 MPa water potential for each tested solute. The quality of maize and soybean seeds was evaluated by the application of germination, health and vigor (first germination count, electrical conductivity) tests and by the analysis of the enzymatic systems. Based on the results, water imbibition by both species of seeds was reduced at the highest water potentials in the presence of both *S. maydis* and *C. truncatum*. Under those conditions, lower water absorption by seeds and lower radicle elongation were observed. Among the water restriction treatments, NaCl was the most harmful solute, regardless the presence or absence of both fungal species. Regarding inoculation, mannitol provided the most favorable conditions for the incidence of both pathogens, and PEG 6000 provided the lowest values of incidence of those pathogens. In relation to the

*Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Adviser); Renato Mendes Guimarães – UFLA

enzymatic systems, malate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, catalase and esterase, presented increases in their electrophoretic patterns at the water potential of -1,2 MPa which was not the case for superoxide dismutase, whose electrophoretic pattern was not affected by any restriction treatment, regardless of the presence or absence of the pathogens in the substrate.

1 INTRODUÇÃO

A associação de patógenos com sementes é considerada um aspecto de grande importância atualmente, em todo o mundo, em razão dos reflexos que este tipo de interação pode provocar, em termos de danos e prejuízos aos sistemas de cultivo de espécies de interesse humano para diversas finalidades. Ao longo dos anos, espécies vegetais, como milho, soja, algodão, feijão, trigo, arroz e outras, propagadas por sementes verdadeiras, vêm merecendo uma atenção crescente, notadamente no que diz respeito ao papel de suas sementes como veículo de disseminação e introdução de doenças em áreas de cultivo ainda livres de problemas sanitários ou áreas de cultivo já tradicionais, nas quais o inóculo de patógenos pode ser acumulado (Machado & Pozza, 2005).

Para estudos mais aprofundados sobre as reais relações de patógenos com seus hospedeiros, em geral, é necessário o emprego de métodos de pesquisa confiáveis e práticos. Neste âmbito, percebe-se que a pesquisa sobre detecção de fungos em sementes e o manejo visando ao controle de doenças associadas a essas interações ainda carecem de mais atenção. Atualmente, uma das grandes dificuldades para estudos sobre detecção de patógenos e tratamento sanitário de sementes reside na disponibilização de sementes infectadas por estes microrganismos, em ocasiões de interesse do pesquisador. Nesse sentido, estudos sobre a aplicação da restrição hídrica em pesquisas têm sido de grande utilidade e, cada vez mais, tem possibilitado o entendimento mais aprofundado sobre esse tipo de interação. Essa técnica está sendo empregada com sucesso para inocular patógenos em sementes e para controlar a germinação das sementes em testes de sanidade, em substituição aos métodos do congelamento e ao uso do herbicida 2,4-D (Coutinho & Machado, 2002; Machado et al., 2002).

Portanto, tal ferramenta tem sido útil para a compreensão de diversos aspectos sobre as relações entre patógenos e sementes de algumas espécies

hospedeiras. Para patógenos como *Stenocarpella maydis*, transmitido por sementes de milho e *Colletotrichum truncatum*, transmitido por sementes de soja, a aplicação da referida técnica pode elucidar uma série de eventos nas interações desses patógenos com as sementes dessas espécies.

Diante do exposto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade do uso da técnica de restrição hídrica em estudos de interação entre patógenos e sementes, com base em análises de padrões de embebição e variáveis de qualidade de sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Padrão de embebição de sementes sob condições de restrição hídrica

O processo de germinação de sementes envolve algumas etapas bem definidas e isto é retratado na forma de modelos que, embora sigam padrões semelhantes em geral, devem ser determinados para cada espécie vegetal, em razão dos inúmeros fatores que podem influenciar esse tipo de absorção de água.

O processo de germinação é iniciado com entrada de água nas sementes por embebição e a utilização de substâncias de reserva da própria semente (Popinigis, 1985). Em condições normais de germinação, as sementes apresentam, geralmente, padrão trifásico de embebição (Bewley & Black, 1994).

Durante a fase inicial do processo de germinação, ocorre o reparo metabólico dos componentes celulares, as membranas se reorganizam, restabelecendo a permeabilidade seletiva e evitando a exsudação excessiva de eletrólitos (Marcos Filho, 2005).

Na Fase I (fase inicial de embebição), ocorre rápida absorção de água e início da degradação das reservas das sementes, decorrente das forças mátricas que atuam nos tecidos das mesmas. A Fase II é caracterizada pelo transporte ativo das reservas desdobradas na fase anterior para o tecido meristemático e por pequenas mudanças no conteúdo de água das sementes. Na Fase III de germinação, ocorre o alongamento celular e a protrusão de radícula, resultantes da organização de substâncias complexas desdobradas na Fase I e transportadas na Fase II (Carvalho & Nakagawa, 2000). A protrusão da radícula ocorre quando o conteúdo de água da semente atinge um nível dependente do potencial hídrico de equilíbrio entre a semente e o meio externo (Bradford, 1986).

A velocidade de embebição depende da disponibilidade hídrica, do potencial osmótico da solução que umedece o substrato, do tempo de exposição da semente ao ambiente úmido, da temperatura e de características intrínsecas da

semente, tais como tamanho, composição química, permeabilidade da cobertura protetora, teor de água inicial e qualidade fisiológica (Popinigis, 1985).

Sabe-se que, para cada espécie, é necessário avaliar o período de embebição, sem que ocorra a protrusão radicular, bem como estudar o efeito da restrição hídrica sobre a qualidade das sementes, considerando que a exposição das sementes ao tratamento por tempo prolongado, além de promover a protrusão radicular, pode ocasionar perda da viabilidade, bem como favorecer a lixiviação de substâncias celulares (Marcos Filho, 2005; Timóteo, 2007; Albuquerque, 2009).

Rossetto et al. (1997), trabalhando com sementes de soja, constataram que, no decorrer do processo de absorção de água, a velocidade de embebição decresceu com a redução do potencial hídrico inicial do substrato e com o aumento do teor de água inicial das sementes. Em condições de baixa disponibilidade hídrica, a absorção de água se torna lenta e, dessa forma, as sementes liberam exsudatos.

Em estudos sobre a hidratação de diferentes partes da semente de soja, pode-se observar que a semente inteira e cada estrutura funcional absorveram água de maneira semelhante ao padrão trifásico descrito por Bewley & Black (1994), embora não tenha ocorrido acentuado aumento na quantidade de água absorvida, no início da Fase 3, por cotilédones e sementes (Villela et al., 2007).

Em pesquisa semelhante, com o objetivo de estudar a marcha de absorção de água em sementes de milho e de suas estruturas funcionais observou-se que a semente inteira e cada estrutura funcional absorveram água de forma similar ao padrão trifásico, embora, para sementes e cariopses sem embrião, não tenha ocorrido pronunciado aumento na absorção de água no início da Fase 3 (Villela et al., 2003).

Entretanto, em Patologia de Sementes, estudos relacionando a velocidade de embebição e a disponibilidade hídrica quando as sementes são

expostas a diversos solutos, em diferentes potenciais hídricos e períodos de tempo, necessitam ser avaliados em relação aos efeitos na germinação e absorção de água das sementes, na presença e ausência de patógenos.

2.2 Restrição hídrica nas relações entre sementes e microrganismos

A qualidade de sementes pode ser afetada por diversos fatores, dentre eles, os microrganismos são considerados um dos mais importantes, por estarem relacionados com deterioração, baixa germinação e vigor. Além disso, as sementes infestadas (ou infectadas) podem ser importante veículo de disseminação e introdução de agentes fitopatogênicos em novas áreas.

Dessa forma, os prejuízos causados às culturas, principalmente por fungos, têm exigido estudos mais detalhados da interação patógeno-hospedeiro. No entanto, pelas dificuldades de obter sementes com diferentes níveis de infecção por estes patógenos, a inoculação artificial das sementes se torna necessária para a realização de estudos epidemiológicos, de transmissibilidade e de controle, entre outros (Machado et al., 2001a).

Entretanto, a inoculação de sementes por contato direto com os fungos em meio agarizado, pode determinar níveis insatisfatórios de infecção, pelo fato de limitar o tempo de permanência das sementes junto ao meio, visto que podem iniciar o processo de germinação em curto período de tempo (Machado et al., 2001b).

Assim, a técnica da restrição hídrica em substrato agarizado, como um método de inoculação, tem sido eficazmente utilizada na inoculação de fungos em sementes com vantagem em relação aos outros métodos tradicionais. Nesta técnica ocorre a inibição da germinação de sementes de diferentes espécies, sem interferir no crescimento micelial do fungo, permitindo prolongar o período de exposição das sementes ao patógeno, proporcionando maior grau de associação entre eles. Dessa forma, é possível realizar estudos das relações patógeno-

semente com diferentes potenciais de inóculo (Amaral et al., 1996; Carvalho, 1999; Machado et al., 2001a,b, 2004; Costa et al., 2003).

Visando o teste de sanidade, a técnica de restrição hídrica tem sido empregada com a finalidade de inibir ou retardar o comprimento radicular das sementes analisadas, como método alternativo ao uso do congelamento e 2,4-D, considerando que a protrusão radicular dificulta a análise e a identificação dos fungos desenvolvidos, além de permitir contaminações secundárias (Coutinho, 2000; Machado, 2002). Nessa técnica, o potencial hídrico do substrato é ajustado para que a semente absorva água até um nível em que todos os processos preparatórios à germinação ocorram, sem, contudo, atingir a fase de alongamento celular e, conseqüentemente, a protrusão radicular.

O ajuste do potencial hídrico em substratos agarizados normalmente é feito pela adição de solutos osmoticamente ativos, como $MgSO_4$, $NaCl$, $MgCl_2$, K_3PO_4 , KH_2PO_4 , glicerol, manitol e sacarose ou pela adição de polietilenoglicol (PEG 6000), geralmente em meios líquidos, pois o ágar não se solidifica na presença deste soluto, como já verificado por Brownell & Schneider (1985).

Entretanto, sais e açúcares têm sido extensivamente utilizados como solutos osmóticos, mas ambos podem ser absorvidos pelas sementes, resultando em alteração do gradiente de potencial hídrico e efeitos tóxicos em alguns casos. Assim, a restrição hídrica pode, muitas vezes, causar danos à qualidade fisiológica das sementes, como alteração na membrana, bem como oxidação de lipídeos, perda de proteínas associadas às membranas e desnaturação de proteínas, entre outros (Marcos Filho, 2005).

Dessa forma, a técnica da restrição hídrica relatada em trabalhos de inoculação de fungos em sementes e teste de sanidade, necessita ser avaliada para determinação dos danos causados à semente e seu efeito sobre a qualidade fisiológica.

Estudos sobre a interação e os efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, em sementes de feijão, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão, *Stenocarpella maydis* em sementes de milho e *C. truncatum* em sementes de soja, foram iniciados na Universidade Federal de Lavras. Até o momento, há expressivos avanços em ajustes de metodologias e novos conhecimentos sobre este tipo de interação biológica. Como exemplo, pode-se citar o estabelecimento da metodologia de infecção artificial de sementes de feijão, algodão, milho e soja por importantes patógenos, como *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Costa, 2000), *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *C. lindemuthianum* (Carvalho, 1999), *S. maydis* (Machado et al., 2001b), *Phomopsis sojae*, *C. truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, dentre outros (Machado et al., 2001a), utilizando o princípio da restrição hídrica das sementes, constituindo tema para exploração em etapas subseqüentes.

Carvalho (1999) demonstrou que a utilização da restrição hídrica em meio BDA com manitol foi eficaz na inoculação de *C. lindemuthianum* em sementes de feijão, já que o período de exposição das sementes ao inóculo do fungo pôde ser aumentado. Houve também, neste caso, estímulo ao crescimento radial das colônias fúngicas até a restrição hídrica de -0,8MPa. Em contrapartida, utilizando meio BDA, modificado osmoticamente com PEG 6000, verificou-se que o aumento do potencial osmótico afetou negativamente o crescimento radial das colônias.

De acordo com a literatura, a inoculação de *Colletotrichum gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodão por meio da restrição hídrica, utilizando meio BDA com manitol ajustado a diversos potenciais hídricos, permitiu maior tempo de exposição das sementes aos patógenos, possibilitando a obtenção de sementes com diferentes potenciais de inóculo,

proporcionando maiores índices de infecção de sementes de algodoeiro, bem como maior porcentagem de plântulas infectadas (Machado et al., 2004; Araújo et al., 2006).

Da mesma forma, a inoculação de sementes de soja com *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae* e *Sclerotinia sclerotiorum* e, sementes de milho com *Stenocarpella maydis*, *Cephalosporium acremonium* e *Fusarium moniliforme*, utilizando a técnica de restrição hídrica com manitol em diferentes potenciais hídricos, proporcionou maiores índices de plantas doentes, além de ter inibido a protrusão radicular das sementes nos potenciais mais elevados, sem que o processo de germinação tenha sido afetado, após o período de incubação (Machado et al., 2001a,b).

O soluto manitol também pode ser utilizado em meio Neon, nos potenciais -1,0 MPa e -1,2 MPa, visando à inibição da germinação de sementes de feijão durante o teste de sanidade para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*, em substituição ao uso do 2,4-D, sem afetar o crescimento do referido fungo (Magalhães, 2005).

Os efeitos da restrição hídrica em testes de sanidade pelo método de incubação em substrato de papel foram também estudados para sementes de algodão, utilizando manitol e cloreto de sódio em vários potenciais, sendo estes restritores eficazes em reduzir a germinação das sementes e o comprimento radicular durante análise sanitária (Machado et al., 2007).

2.3 Sistemas enzimáticos na determinação da qualidade fisiológica de sementes submetidas à restrição hídrica.

O emprego do princípio de restrição hídrica, já conhecido em tecnologia de sementes visando a potencialização do processo de germinação de algumas espécies, foi inicialmente testado no Laboratório da Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, como parte de metodologia de inoculação de

sementes com alguns fungos e bactérias de interesse no Brasil (Machado & Langerak, 2002).

A inoculação de sementes por meio desta técnica apresenta-se eficiente e bastante promissora para todos os patossistemas estudados (Carvalho, 1999; Machado, 2002; Costa et al., 2003; Celano, 2004; Machado et al., 2004; Sousa et al., 2008). Porém, a inoculação pelo contato de sementes com colônias de fungos em substrato utilizando a técnica da restrição hídrica tem limitações.

A exposição das sementes sobre um substrato, durante o tempo requerido para infecção maior que 36h pode causar danos, de modo que o soluto utilizado na restrição hídrica pode tornar-se tóxico ou causar alterações estruturais nas sementes, penetrando através dos sistemas de membranas, além de degradar macromoléculas, tais como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e, conseqüentemente, a diminuição de atividades bioquímicas de sementes (Coolbear, 1995; Machado et al., 2002; Ribeiro et al., 2002).

Pesquisas têm mostrado que atividades do ciclo celular, incluindo atividades de enzimas, têm grande potencial como marcadores bioquímicos, para monitorar e caracterizar a qualidade fisiológica de sementes submetidas à restrição hídrica. Os marcadores se constituem em ferramentas de grande valor, pois, além de auxiliar no diagnóstico do estado fisiológico de sementes, podem, em determinados casos, ajudar na inferência sobre as causas da perda de vigor e viabilidade (Ribeiro, 2000; Timóteo, 2007).

Dentre as enzimas utilizadas como marcadores, destacam-se, principalmente, as que estão envolvidas nos processos respiratórios como a malato desidrogenase (MDH) e álcool desidrogenase (ADH), bem como as removedoras de radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), além das enzimas que atuam no metabolismo de lipídios, como as esterases (EST) (Albuquerque, 2009).

A enzima malato desidrogenase (MDH) atua no metabolismo aeróbico de plantas e está associada à conversão de malato a oxaloacetato, tendo importante função dentro do ciclo de Krebs. Contudo, espera-se que a atividade da MDH seja intensa nos primeiros estádios do processo de germinação, quando a síntese de novos tecidos da semente requer mais energia para o crescimento. Já a enzima álcool desidrogenase (ADH) desempenha importante função em condições anaeróbicas, reduzindo o acetaldeído a etanol (Ribeiro, 2000; Albuquerque, 2009).

As superóxidos dismutase (SOD) são um grupo de enzimas que atuam como mecanismos antioxidantes, protegendo as células contra a ação de diversas formas de oxigênios ativos. São encontradas no citoplasma celular e na matriz mitocondrial e catalizam a reação de dismutação de radicais superóxidos livres ($O_2^{\cdot-}$) produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio gerado é decomposto principalmente pela catalase (CAT), cujas subunidades são formadas no citoplasma, sendo a síntese completada no peroxissomo (McDonald, 1999; Ribeiro, 2000; Rosa et al., 2005; Silva, 2006).

A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, desempenhando papel chave no metabolismo de lipídeos, ponto importante no processo deteriorativo de sementes (Vieira, 1996).

Uma variação nos padrões eletroforéticos das enzimas álcool desidrogenase e esterase foi observada em sementes de algodão durante o condicionamento fisiológico, porém, os padrões permaneceram inalterados para as enzimas glutamato desidrogenase e catalase (Ribeiro, 2000).

Em algumas pesquisas têm sido relatado que, durante o condicionamento fisiológico, ocorrem mudanças na taxa respiratória das sementes e atividade de enzimas específicas, embora, em alguns casos, não tenham ocorrido mudanças quantitativas na atividade destas (Timóteo, 2007).

A presença de microrganismos nas sementes e o nível de qualidade fisiológica das mesmas também podem alterar os padrões eletroforéticos de isoenzimas (Brandão Júnior, 1996; Vieira, 2004).

A associação dos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. com sementes de milho foi avaliada por meio de padrões eletroforéticos das isoenzimas álcool-desidrogenase, malato-desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato-transaminase, em que observou-se redução na qualidade fisiológica, possivelmente pela interferência dos referidos fungos no metabolismo das sementes, propiciando alterações nos padrões isoenzimáticos (Silva et al., 2000).

Em pesquisa realizada por Vieira (1996), sobre a deterioração de sementes de algodoeiro e a presença e ausência de duas espécies de *Aspergillus*, normalmente associadas aos lotes de sementes, foi possível também constatar que isoenzimas podem atuar como marcadores bioquímicos em estudos sobre o nível de deterioração de sementes de algodoeiro.

Dessa forma, o principal desafio das pesquisas em Patologia de Sementes está na identificação de parâmetros relacionados à determinação da qualidade fisiológica das sementes, quando submetidas ao método da restrição hídrica, visando à infecção de sementes.

Embora existam, na literatura, trabalhos que estudem os efeitos da restrição hídrica nas sementes, faltam evidências de tais efeitos desta técnica, em termos de alterações enzimáticas, quando aplicada em Patologia de Sementes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia e, no Laboratório Central de Sementes, do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras - MG.

Foi utilizado um isolado monospórico de *Stenocarpella maydis* (MY2) fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas/MG, e um isolado monospórico de *Colletotrichum truncatum*, associado às sementes de soja, produzidas nas regiões do Estado de Minas Gerais. As culturas fúngicas foram conservadas pelo método de Castellani (Figueiredo, 1967).

Para a condução dos trabalhos, foram utilizadas sementes de milho híbrido triplo, variedade 3041, safra 2006/2007, fornecidas pela empresa Pioneer Sementes, e sementes de soja, cultivar FMT Tucunará, safra 2007/2008, fornecida pela Fazenda Arco-Íris, localizada no município de Alto Garças/MT.

O perfil sanitário e fisiológico inicial dos lotes de sementes de milho e soja foi determinado pelos testes de germinação, sanidade e grau de umidade, conforme descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Em sementes de milho, a porcentagem de germinação foi de 92% e a de umidade 12%, enquanto em sementes de soja a germinação foi de 95% e umidade 10%. Em relação à sanidade, não foi observada a presença dos patógenos *Stenocarpella maydis* e *Colletotrichum truncatum*, em sementes de milho e soja, respectivamente.

3.1 Estabelecimento das curvas de embebição de sementes de milho e soja, na presença e ausência de *Stenocarpella maydis* e *Colletotrichum truncatum*, respectivamente, em substrato com diferentes restritores e potenciais hídricos.

Sementes de milho e soja, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1%, por sessenta e trinta segundos, respectivamente, com posterior lavagem em água destilada, foram submetidas aos potenciais hídricos 0,0; -0,8; -1,2 e -1,6 MPa, com o uso dos solutos PEG 6000 diluído em batata-dextrose (BD) e manitol e NaCl diluídos em batata-dextrose-ágar (BDA), com a presença dos fungos sobre o substrato, semelhante ao procedimento adotado para inoculação de sementes com fungos (Machado et al., 2001a,b; Freitas, 2006). Para o ensaio elaborado na ausência dos fungos, os solutos foram ajustados aos mesmos potenciais hídricos já citados.

A concentração da solução de PEG 6000 foi determinada conforme tabela desenvolvida por Villela et al. (1991), sendo as concentrações das soluções de manitol e NaCl determinadas utilizando o Software SPMM, para temperatura de 25°C (Michel & Radcliffe, 1995).

Foram empregadas dez sementes/espécie/tratamento, sendo cada semente equivalente a uma repetição neste ensaio. As sementes foram pesadas e distribuídas em placas de Petri de 15cm de diâmetro, sobre três discos de papel de filtro umedecidos com 40 mL das soluções utilizadas. A incubação das sementes em placas foi feita em câmara de germinação tipo BOD, com temperatura previamente regulada a 25±1°C e fotoperíodo de 12 horas.

Para a caracterização da marcha de absorção de água em sementes de milho, sob restrição hídrica e na presença dos fungos, foram consideradas as Fases I e II até o início da Fase III de embebição, ocasião em que ocorre protrusão da raiz primária.

A absorção de água pelas sementes foi monitorada por meio de pesagens consecutivas realizadas em cada amostra, individualmente, usando uma balança com precisão de 0,0001 g, em intervalos regulares pré-estabelecidos.

Durante o ensaio de avaliação do padrão de embebição das sementes de milho e soja, na presença ou ausência dos fungos, monitorou-se o tempo (hora) que ocorreu o início da protrusão radicular (comprimento $\geq 0,1$ cm). No período final do ensaio (120 horas), avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas (comprimento da raiz primária maior ou igual à dimensão da semente).

3.2 Avaliação do desempenho das sementes de milho e soja submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência dos fungos *S. maydis* e *C. truncatum*

As condições de restrição hídrica e inoculação, empregadas para a avaliação do desempenho das sementes foram definidas com base nas curvas de embebição realizadas preliminarmente, sendo selecionado o potencial hídrico - 1,2 MPa para dar seqüência a esta etapa. O período de exposição das sementes em cada soluto, neste potencial, foi selecionado com base no período de embebição que antecedeu a protrusão radicular das sementes em cada restritor testado, conforme Tabela 1.

Nesta etapa, a testemunha foi uma amostra de sementes do lote comercial, sem contato com a restrição hídrica e com os fungos, com a finalidade de evidenciar os reais efeitos da restrição hídrica e dos patógenos sobre a qualidade das sementes.

TABELA 1 Condições de restrição hídrica e inoculação das sementes de milho x *Stenocarpella maydis* e soja x *Colletotrichum truncatum*, empregadas para a avaliação do desempenho das sementes.

Espécie	Presença/ ausência do fungo	Período (h) de condicionamento das sementes		
		Manitol -1,2 MPa	NaCl -1,2 MPa	PEG 6000 -1,2 MPa
Soja	-	56	48	120
	+	120	120	120
Milho	-	64	36	120
	+	72	72	120
Testemunha		Tempo zero (0)		

Na inoculação das sementes de milho e soja, por meio da restrição hídrica com manitol e NaCl, as mesmas foram colocadas em contato com as colônias dos fungos *S. maydis* e *C. truncatum*. Dessa forma, discos da colônia pura dos patógenos foram distribuídos em placas de Petri de 15 cm de diâmetro sobre três folhas de papel de filtro umedecidas com meio diluído e modificado com os solutos. Para a inoculação com PEG 6000, discos de micélio foram colocados para crescer em meio (BD), sob agitação, por 48 horas e, posteriormente, distribuído nas placas, conforme descrito acima.

Após o desenvolvimento das colônias fúngicas, 40 gramas de sementes de cada espécie, previamente desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio 1%, foram distribuídas uniformemente, em camadas simples, sobre as colônias e mantidas em incubação em câmara de germinação tipo BOD, com temperatura previamente regulada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, pelo período estabelecido para cada soluto e espécie (Tabela 1). Da

mesma forma, sementes foram colocadas em contato com os meios, porém, livres de inóculo.

Após a exposição das sementes às colônias fúngicas e restritores, nos períodos estabelecidos, estas foram retiradas das placas de Petri, desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% e distribuídas sobre papel germitest, em temperatura ambiente, para secagem. Posteriormente, as sementes foram armazenadas em câmara fria e seca, onde permaneceram até o momento das avaliações.

As sementes expostas aos tratamentos de restrição hídrica, inoculadas ou não, foram submetidas à avaliação da qualidade sanitária pelo *Blotter test*, enquanto a qualidade fisiológica foi determinada pelos testes de germinação, primeira contagem do teste de germinação, condutividade elétrica, além de análises de sistemas enzimáticos, conforme descrito a seguir:

3.2.1 Teste de Sanidade

A qualidade sanitária das sementes de milho foi avaliada pelo método de incubação em substrato de papel com congelamento e das de soja pelo método de incubação em substrato de papel embebido em ágar-água a 0,5% com 2,4-D na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Foram distribuídas 200 sementes (oito repetições de 25) em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com os meios específicos para cada espécie, conforme citado anteriormente. As placas foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Ao final desse período, as sementes foram examinadas individualmente ao microscópio estereoscópio, verificando-se a incidência dos fungos *Stenocarpella maydis* em milho e *Colletotrichum truncatum* em soja.

3.2.2 Teste de germinação e primeira contagem

O teste de germinação foi conduzido com 200 sementes (quatro repetições de 50 sementes) distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) umedecido com água destilada 2,5 vezes o peso do papel seco, em germinador regulado à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas aos quatro e aos sete dias após a semeadura para o milho e, aos cinco e oito dias para soja, conforme os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

A primeira contagem do teste de germinação foi realizada em conjunto com o teste de germinação, avaliando-se o número de plântulas normais aos quatro dias após a semeadura para o milho e aos cinco dias para a soja.

3.2.3 Teste de condutividade elétrica

Para avaliação da condutividade elétrica das sementes de soja e milho, foram utilizadas 200 sementes (quatro repetições de 50 sementes) por tratamento, para cada espécie. Cada sub-amostra foi inicialmente pesada em balança de precisão 0,0001g e acondicionada em recipientes contendo 75 mL de água deionizada, sendo mantida em uma câmara, à temperatura de 25°C , por 24 horas. Após esse período, efetuou-se a leitura da condutividade elétrica da solução de embebição das sementes, com o auxílio de um condutivímetro DIGIMED, modelo DM-21, previamente calibrado com solução de KCl. O resultado obtido no condutivímetro foi dividido pelo peso da amostra ou repetição, sendo o resultado final expresso em $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, conforme descrito em Krzyzanowski et al. (1999).

3.2.4 Determinação dos padrões eletroforéticos de enzimas

A extração de enzimas seguiu metodologia utilizada por Imolesi (1999). Foram amostradas 100 sementes de milho e soja por tratamento e trituradas em moinho refrigerado na presença de antioxidante polivinil pirrolidone, ou PVP, de acordo com Konarev (1988) e conservadas em freezer a -84°C .

Inicialmente, para as amostras de soja, foi necessário realizar a lavagem com acetona (300 μL) diluída em água destilada (300 μL), para extração da gordura. Neste caso, para cada tratamento, foram utilizados microtubos contendo 100 mg das amostras de soja e 600 μL da solução de lavagem, centrifugados a 14000 rpm, por 30 minutos. Após, o sobrenadante foi vertido e reservado o pellet.

Em seguida, às amostras de milho e soja foram acrescentados 250 μL do tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH 8,0 + 0,1% de β -mercaptoetanol) e mantidas refrigeradas, sobre gelo, *overnight*. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, por 30 minutos, a 4°C .

Posteriormente, foram aplicados 60 μL do sobrenadante das amostras de milho e soja, em gel de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador), para revelação das enzimas ADH, MDH e catalase. Para revelação da esterase, aplicaram-se 60 μL do sobrenadante das amostras de milho e 80 μL para as amostras de soja. No caso da SOD, utilizaram-se 80 μL para as amostras de milho e, para as amostras de soja, foram aplicados 60 μL do sobrenadante adicionado de 60 μL do tampão de extração.

O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina pH 8,9%, diluído em água, na proporção 1:10. As corridas foram efetuadas a 120 V por, aproximadamente, quatro horas. Após a eletroforese, os géis foram revelados e corados para os sistemas enzimáticos: álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), catalase, esterase e superóxido dismutase (SOD), seguindo metodologia descrita por Alfenas et al. (1991).

3.3 Delineamento experimental e análise estatística

3.3.1 Avaliação da germinação e vigor (primeira contagem e condutividade elétrica)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 (três restritores hídricos: manitol, NaCl e PEG 6000; na presença e na ausência do fungo), com um fator adicional (testemunha) e quatro repetições.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, em que foram determinados os efeitos dos restritores, da presença dos fungos e da interação entre os dois fatores. As médias do fator restritor foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância; as médias do fator fungo, devido à existência de apenas dois níveis (presença e ausência), foram comparadas pelo teste F, a 5% de significância e as médias dos tratamentos (fatorial) foram comparadas com a média da testemunha (fator adicional) por meio do teste de Dunnett, a 5% de significância.

3.3.2 Teste Sanidade

Para o teste de sanidade foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três tratamentos (três restritores hídricos: manitol, NaCl, PEG 6000) e quatro repetições.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando-se o programa computacional Sisvar 4.0 (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento da curva de embebição de sementes de milho, submetidas à restrição hídrica, na presença e na ausência do fungo *Stenocarpella maydis*

A marcha de absorção de água em sementes de milho sob condições de restrição hídrica, na presença e na ausência de *Stenocarpella maydis*, pode ser observada nas Figuras 1, 2 e 3.

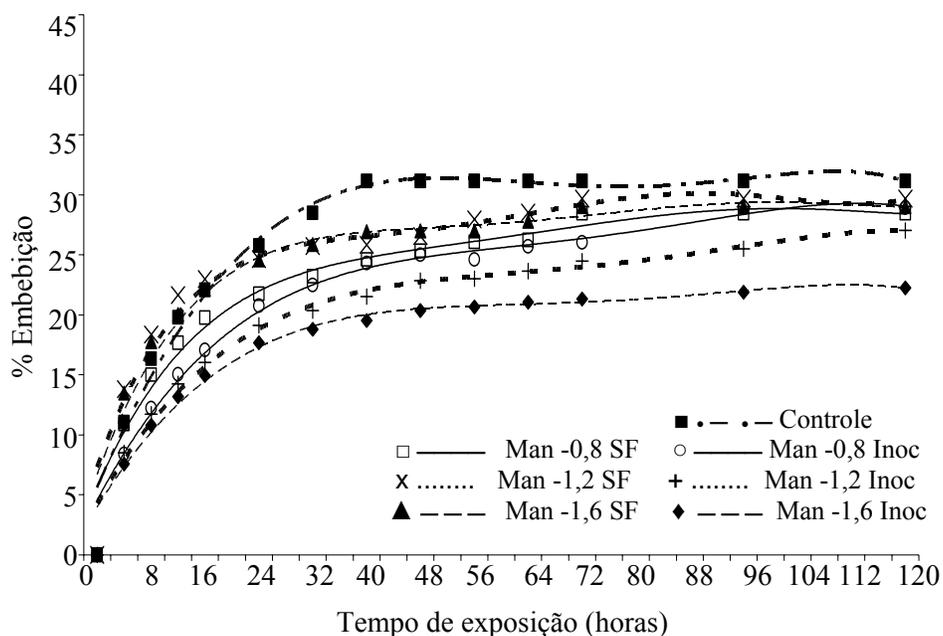


FIGURA 1 Padrão de absorção de água em sementes de milho, sob diferentes níveis de restrição hídrica com manitol, na presença (Inoc) e na ausência (SF) do fungo *Stenocarpella maydis*.

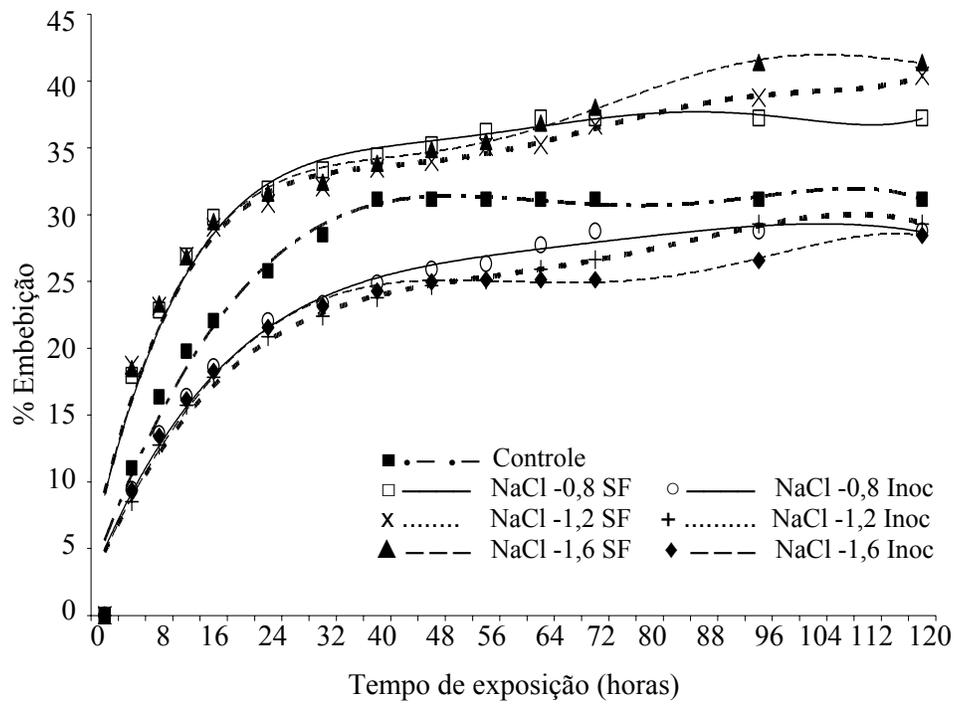


FIGURA 2 Padrão de absorção de água em sementes de milho, sob diferentes níveis de restrição hídrica com NaCl, na presença (Inoc) e na ausência (SF) do fungo *Stenocarpella maydis*.

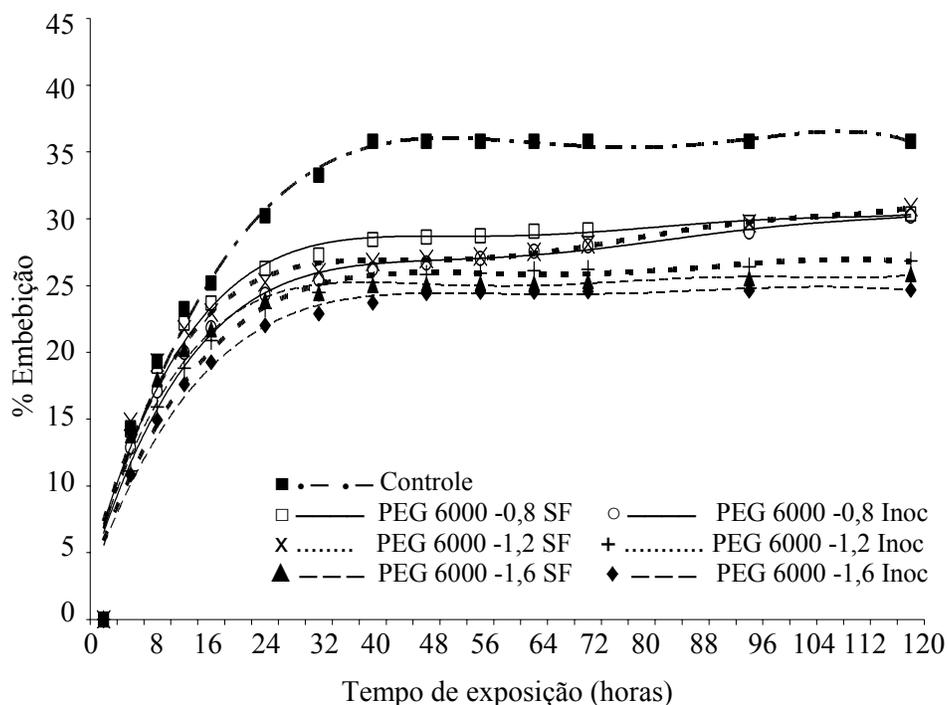


FIGURA 3 Padrão de absorção de água em sementes de milho, sob diferentes níveis de restrição hídrica com PEG 6000, na presença (Inoc) e na ausência (SF) do fungo *Stenocarpella maydis*.

Com base nos resultados, ficou evidente que a presença de *Stenocarpella maydis* no substrato de papel umedecido com os meios modificados com os diferentes restritores interferiu na embebição das sementes de milho, havendo, nessas condições, redução na absorção de água pelas sementes, decrescente com a redução do potencial hídrico do substrato (Figuras 1, 2 e 3). A absorção lenta de água pelas sementes nestas condições deveu-se, provavelmente, à absorção de água pelo fungo em desenvolvimento, o que pode ter contribuído para a redução do potencial hídrico do meio.

De modo geral, nos substratos modificados com os diferentes restritores, as sementes concluíram a Fase I após 24 horas de embebição, ocasião em que o ganho de peso pelas sementes é considerável e a velocidade de embebição é relativamente alta, em função da diferença entre os potenciais hídricos das sementes e do substrato. Por sua vez, as sementes não condicionadas osmoticamente (controle) completaram a Fase I após aproximadamente 32 horas de embebição.

A duração da Fase II de embebição das sementes de milho foi variável entre os tratamentos, sendo o período de tempo prolongado com a redução do potencial hídrico do substrato e a presença do fungo. Esta relação pode ser observada na Tabela 2, em que são apresentados os dados referentes ao tempo que antecede a protrusão radicular das sementes, ou seja, o final da fase II de embebição.

Esses resultados estão de acordo com relatos de que a duração da Fase II de embebição das sementes é inversamente proporcional ao potencial hídrico do substrato, ou seja, a duração dessa fase será tanto maior quanto menor for o potencial hídrico do substrato. Vale salientar que a Fase II (fase de absorção estacionária) é caracterizada por baixa absorção de água; aparentemente um platô dirigido pelo potencial osmótico, tendo em vista que os potenciais hídricos das sementes e do substrato se aproximam (Marcos Filho, 2005).

O tempo para o início da protrusão radicular das sementes embebidas em substratos modificados osmoticamente é variável de acordo com o patossistema. Assim, do ponto de vista da aplicação da restrição hídrica, ou condicionamento fisiológico, em estudos de inoculação de sementes visando à infecção, a caracterização do padrão de embebição é importante e se justifica pela necessidade da secagem posterior das sementes para uso em diferentes finalidades, uma vez que, ocorrendo a emissão da radícula, as sementes perdem a tolerância à dessecação (Bewley & Black, 1994; Marcos Filho, 2005).

Na Tabela 2 são apresentados os teores de água e os tempos que antecedem a protrusão radicular das sementes de milho submetidas à restrição hídrica durante a embebição, na presença e na ausência de *S. maydis*.

TABELA 2 Tempo (h) que antecede a protrusão (TP₀) e umidade (%) de sementes de milho submetidas à restrição hídrica durante a embebição, na presença e na ausência de *Stenocarpella maydis*.

Tratamento		<u>Manitol</u>		<u>NaCl</u>		<u>PEG 6000</u>	
		S/Fungo	C/Fungo	S/Fungo	C/Fungo	S/Fungo	C/Fungo
-0,8	TP ₀	40	40	32	64	64	64
MPa	Umidade	28,59	27,36	33,23	30,02	31,07	29,52
-1,2	TP ₀	64	72	36	72	SP	SP
MPa	Umidade	32,27	27,74	32,90	28,96	32,00	29,04
-1,6	TP ₀	64	SP	40	96	SP	SP
MPa	Umidade	30,92	26,41	33,35	28,91	29,31	27,83
TEST	TP ₀	32					
	Umidade	30,77					

SP = sem protrusão até 120 horas; S/Fungo = sem fungo; C/Fungo = com fungo

Com relação ao grau de umidade das sementes submetidas à restrição hídrica com diferentes restritores e potenciais hídricos, na presença e na ausência do fungo, observa-se que, no tempo que antecede o início da protrusão radicular (TP₀), o teor de água das sementes variou de 27 a 33% (Tabela 2).

Estes resultados estão de acordo com Villela et al. (2003), que estudaram a marcha de absorção de água de sementes de milho e observaram teores de água na faixa de 28 a 29%, após 36 horas de embebição, ao final da Fase II de embebição. Resultados semelhantes foram observados por McDonald et al. (1994), tendo sementes de milho apresentado teores de água de 31 a 33%, após

24 e 38 horas de hidratação, respectivamente, com o início da emissão da radícula.

De modo geral, constatou-se que o tempo que antecede o início da protrusão radicular (TP_0), para cada restritor utilizado, variou em função do potencial hídrico e da presença de *S. maydis*. A presença do fungo no substrato contribuiu para uma redução da velocidade de absorção de água e, conseqüentemente, para o início da emissão da raiz primária, sendo esse efeito mais evidente nos menores potenciais hídricos (Tabela 2).

Assim, com base no TP_0 para cada restritor e potencial hídrico, é possível inocular as sementes sem que ocorra a protrusão radicular das mesmas. Dentre os restritores estudados, o PEG 6000 foi o soluto que permitiu maior tempo de exposição das sementes de milho sobre o substrato, sem que houvesse emissão da raiz primária, independente da presença do patógeno.

Em outros estudos, a emissão da raiz primária de sementes de milho foi eficazmente impedida nos potenciais hídricos mais elevados, quando se utilizou o soluto manitol adicionado ao meio BDA para inoculação de fungos nas sementes (Machado et al., 2001b). Sementes de milho submetidas à restrição hídrica, em meio modificado com manitol a -1,4 MPa e com NaCl a -1,2 MPa e -1,4 MPa, apresentaram baixa porcentagem de protrusão radicular após 120 horas de incubação e em contato com os fungos estudados (Teixeira et al., 2005).

Do ponto de vista do teste de sanidade, além da protrusão radicular, o comprimento da radícula das sementes também tem sua importância, considerando que, nesse teste, objetiva-se a inibição da protrusão da radícula e/ou a redução do comprimento da mesma, de modo a facilitar a operacionalidade das análises sob microscópio estereoscópio e evitar contaminações secundárias. Entretanto, a inibição da protrusão radicular ou redução do comprimento radicular pode ser obtida por meio da técnica da restrição hídrica, em substituição ao método do congelamento, no caso das

gramíneas. Embora o período de incubação do teste de sanidade seja de sete dias (168 horas), o ensaio de embebição, na ausência do fungo *Stenocarpella maydis*, realizado até 120 horas, o qual foi conduzido em condições semelhantes às do *blotter test*, serviu de suporte para obter essas respostas.

Na Tabela 3, podem ser observados os efeitos da restrição hídrica sobre o comprimento radicular das sementes de milho embebidas em substratos osmoticamente modificados por um período de 120 horas.

TABELA 3 Porcentagem de sementes de milho germinadas (comprimento da raiz primária maior ou igual à dimensão da semente) durante a embebição, sob restrição hídrica e na ausência de *Stenocarpella maydis*, por um período de 120 horas.

Tratamento	Manitol	NaCl	PEG 6000
-0,8 MPa	80	50	10
-1,2 MPa	70	10	0
-1,6 MPa	20	0	0
TEST	100		

De acordo com os resultados, observou-se que o restritor PEG 6000 promoveu maior controle da germinação das sementes de milho, sendo este processo inibido em potenciais hídricos de -1,2 MPa e -1,6 MPa, seguido dos restritores NaCl e manitol, respectivamente.

No entanto, deve-se ter cuidado com o uso do NaCl para induzir restrição hídrica em elevadas concentrações, com a finalidade de proporcionar potenciais hídricos baixos, pois este soluto pode provocar redução no desenvolvimento dos fungos considerados de campo, comprometendo os resultados do teste. De acordo com a literatura, esses potenciais baixos são mais

favoráveis a fungos de armazenamento como espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (Celano, 2003). Além disso, o NaCl em determinadas concentrações, também tem efeito desinfestante para as sementes (Maude, 1996).

Em outros trabalhos, a redução da protrusão radicular e do comprimento da raiz seminal, pelo método da restrição hídrica, foi verificada para espécies como arroz e feijão (Coutinho, 2000), trigo (Celano, 2003), algodão (Machado et al., 2007), sorgo (Magalhães, 2005), utilizando potenciais hídricos em torno de -1,0 MPa, obtidos por diversos solutos.

4.2 Desempenho das sementes de milho submetidas à restrição hídrica, na presença e na ausência do fungo *S. maydis*

Os efeitos da restrição hídrica sobre a germinação e vigor (primeira contagem) das sementes de milho estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 Valores médios (%) de germinação e primeira contagem de sementes de milho submetidas à restrição hídrica com diferentes agentes osmóticos a -1,2 MPa.

Tratamento	Germinação	1ª Contagem
PEG 6000	90a	88a
Manitol	84a	84a
NaCl	77b	72b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

De acordo com os resultados (Tabela 4), verifica-se redução significativa da porcentagem e velocidade (primeira contagem) de germinação das sementes submetidas à restrição hídrica com NaCl. A redução da germinação ocasionada pela salinidade do referido restritor, segundo Tobe et al. (2000), se deve tanto ao efeito osmótico como ao efeito tóxico, resultante da concentração de íons de protoplasma.

Na Tabela 5, podem-se observar os efeitos da restrição hídrica e da presença do fungo *Stenocarpella maydis* na germinação e primeira contagem de sementes de milho. O efeito do patógeno na qualidade das sementes pode ser verificado na Tabela 6.

TABELA 5 Valores médios (%) de germinação e primeira contagem de sementes de milho submetidas à restrição hídrica com diferentes agentes osmóticos a -1,2 MPa, na presença e na ausência do fungo *Stenocarpella maydis*.

Tratamento	% Germinação		1ª Contagem	
	S/Fungo	C/Fungo	S/Fungo	C/Fungo
PEG 6000	95	85*	91	85*
Manitol	93	76*	93	76*
NaCl	83*	72*	83*	62*
Testemunha	97		95	

* Diferem significativamente da testemunha pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$);
S/Fungo = sem fungo ; C/Fungo = com fungo

TABELA 6 Valores médios (%) de germinação e primeira contagem de sementes de milho inoculadas ou não com o fungo *Stenocarpella maydis*.

Tratamento	Germinação	1ª Contagem
Sem fungo	90a	89a
Com fungo	78b	74b

Médias com letra diferente na coluna diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Os dados apresentados na Tabela 5 evidenciam o desempenho germinativo inferior das sementes submetidas à restrição hídrica com NaCl em relação àquelas embebidas em soluções de PEG 6000 e manitol, as quais não diferiram das sementes não condicionadas/inoculadas (testemunha). Porém, a presença do fungo *S. maydis* afetou adversamente a qualidade das sementes submetidas à restrição hídrica, visto que todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha. O efeito desse patógeno nas sementes de milho também pode ser observado na Tabela 6, em que se constata que as sementes inoculadas tiveram significativa redução na germinação e vigor.

De acordo com dados da literatura, o fungo *S. maydis* inoculado em sementes de milho pode causar morte de plântula e podridão de sementes, reduzindo a germinação e o vigor das mesmas (Machado et al., 2001b; Carvalho et al., 2004; Casa et al., 2006).

Na Tabela 7 observam-se os resultados referentes à lixiviação de eletrólitos das sementes submetidas à restrição hídrica com diferentes restritores, na presença e na ausência do fungo *S. maydis*.

TABELA 7 Condutividade elétrica ($\mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) de sementes de milho, inoculadas ou não com *S. maydis*, sob restrição hídrica a -1,2 MPa.

Tratamento	Condutividade Elétrica	
	S/Fungo	C/Fungo
PEG 6000	25,72aA*	27,63aA*
Manitol	27,68aA*	29,95aB*
NaCl	35,21bA*	44,21bB*
Testemunha	22,57	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste F ($P\leq 0,05$). *Diferem significativamente da testemunha pelo teste de Dunnett ($P\leq 0,05$).

Os resultados obtidos no teste de condutividade elétrica (Tabela 7), à semelhança dos resultados de germinação e primeira contagem (Tabela 4), permitem observar diferenças entre os restritores, tanto na ausência quanto na presença do fungo. Os valores de condutividade elétrica para as sementes condicionadas em soluções de PEG 6000 e manitol foram inferiores, evidenciando o efeito negativo da solução de NaCl no sistema de membranas das sementes, o que, provavelmente permitiu maior lixiviação de eletrólitos.

Entretanto, quando se considera a presença do fungo *S. maydis* para cada restritor, individualmente, observa-se que este não teve influência na condutividade elétrica quando se utilizou PEG 6000 como restritor para a inoculação. Porém, para as sementes condicionadas com os demais restritores, a inoculação desse patógeno foi significativa, provocando um aumento da lixiviação de solutos na solução de embebição, ocasionado pela perda da integridade do sistema de membranas celulares, sendo este um dos eventos iniciais do processo de deterioração.

Vale ressaltar que o PEG 6000 é um produto não tóxico de alto peso molecular, não penetrando nas células das sementes; em decorrência, os danos ocasionados às membranas são menores, em relação ao manitol e, principalmente, ao NaCl, os quais têm essa capacidade (Marcos Filho, 2005). Nesse sentido, o PEG 6000 minimizou o efeito do patógeno nas sementes em relação à lixiviação de eletrólitos. Em contrapartida, todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha.

Os resultados referentes à incidência de *Stenocarpella maydis* detectada nas sementes de milho inoculadas sob restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e PEG 6000 estão apresentados na Figura 4.

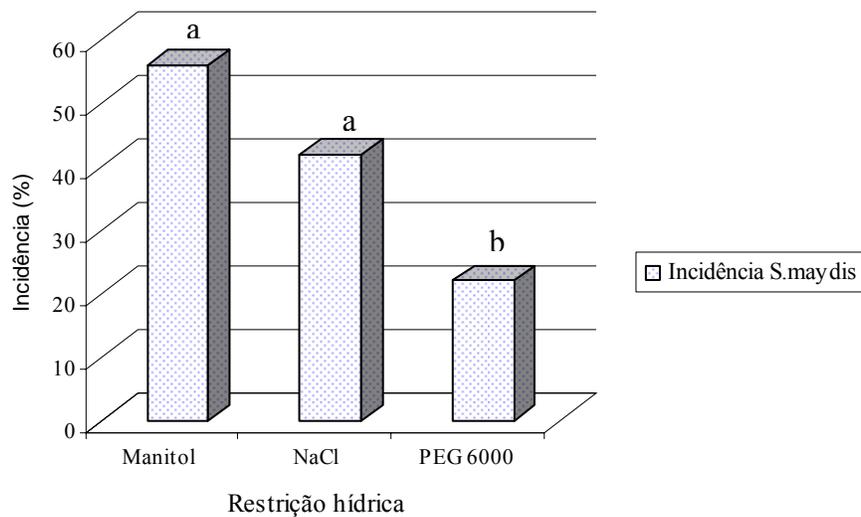


FIGURA 4 Incidência (%) de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho inoculadas sob restrição hídrica a -1,2 MPa.

Com a utilização da técnica de restrição hídrica foi possível inocular as sementes de milho com o fungo *S. maydis*, por um período de incubação de 72 horas, para os restritores manitol e NaCl e de 120 horas para o PEG 6000, sendo todos no potencial hídrico -1,2 MPa. Tais períodos de incubação das sementes em contato com o patógeno foram baseados no tempo que antecedeu a protrusão radicular das sementes durante a embebição (Tabela 2).

Por meio do teste de sanidade, verificou-se a incidência do fungo *S. maydis* inoculado em sementes de milho (Figura 4). O maior percentual de infecção ocorreu nas sementes inoculadas sob restrição hídrica com os restritores manitol e NaCl, diferindo significativamente da incidência do patógeno em sementes condicionadas com PEG 6000.

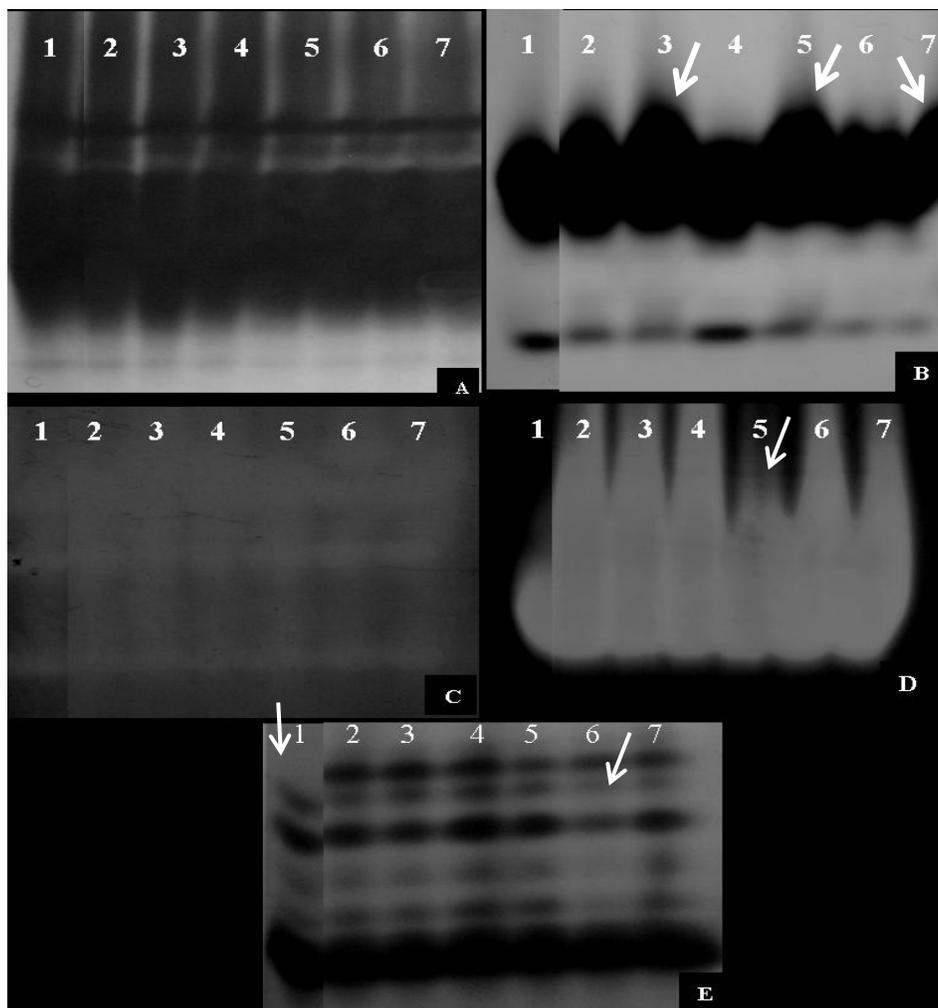
A incidência do patógeno detectada nas sementes reafirma os resultados obtidos por meio do teste de germinação e da primeira contagem (Tabela 5), onde foi possível verificar que a presença do fungo interferiu na qualidade das sementes, sendo que a inoculação com PEG 6000 foi a que causou menor efeito nas características fisiológicas das sementes, provavelmente, por apresentar menor incidência do fungo.

A incidência de *S. maydis* em sementes de milho, inoculadas por meio da técnica de restrição hídrica, já foi relatada em outros trabalhos onde nos quais o maior percentual de infecção ocorreu nos potenciais hídricos mais elevados (-1,2 MPa e -1,4 MPa) do soluto manitol (Machado et al., 2001b; Carvalho et al., 2004; Freitas, 2006).

O fato de o soluto manitol favorecer a maior incidência do patógeno (embora não tenha diferido estatisticamente do sal), em relação aos outros restritores, pode estar relacionado à utilização desse açúcar como fonte adicional de energia pelo fungo (Coutinho et al., 2001).

4.3 Padrões eletroforéticos de sistemas enzimáticos de sementes de milho, submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência de *Stenocarpella maydis*

Os sistemas enzimáticos das sementes de milho submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência de *Stenocarpella maydis*, revelados para malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e esterase (EST), podem ser observados na Figura 5.



1: Controle (sementes não condicionadas/inoculadas, 0 h); 2: Manitol -1,2 MPa (não inoculado 64 h); 3: Manitol -1,2 MPa (inoculado 72 h); 4: NaCl -1,2 MPa (não inoculado 36 h); 5: NaCl -1,2 MPa (inoculado 72 h); 6: PEG 6000 -1,2 MPa (não inoculado 120 h); 7: PEG 6000 -1,2 MPa (inoculado 120 h).

FIGURA 5 Padrões eletroforéticos das enzimas malato desidrogenase (A), álcool desidrogenase (B), superóxido dismutase (C), catalase (D) e esterase (E) em sementes de milho submetidas à restrição hídrica, na presença e na ausência do fungo *Stenocarpella maydis*.

A malato desidrogenase (MDH) desempenha papel importante no ciclo de Krebs (mitocôndria), oxidando malato a oxaloacetato e produzindo NADH (Spinola et al., 2000).

Neste estudo, a atividade da MDH não diferiu entre os tratamentos (Figura 5A), permanecendo estável com relação às condições de restrição hídrica e associação fungo/semente. Entretanto, os restritores promoveram a redução da atividade de isoenzimas de MDH, em relação àquela observada em sementes não tratadas (controle), indicando uma redução da atividade respiratória das sementes submetidas à restrição hídrica.

Resultados semelhantes foram encontrados por Spinola et al. (2000), em sementes de milho, os quais não constataram alterações nos perfis eletroforéticos dessa enzima com o aumento do período de envelhecimento.

Por sua vez, a enzima álcool desidrogenase (ADH) atua no metabolismo anaeróbico, reduzindo acetaldeído a etanol e oxidando NADH a NAD⁺ (Bray et al., 2000).

De acordo com o perfil eletroforético da enzima ADH (Figura 5B), duas isoenzimas (bandas) de ADH (ADH1 [banda superior] e ADH2 [banda inferior]) com padrões de comportamento distintos foram detectadas. Em geral, a atividade da ADH1 foi maior em sementes inoculadas, independente do soluto utilizado no condicionamento osmótico. Nesse sentido, a fermentação alcoólica parece ter sido uma rota alternativa de produção de ATP nas sementes infectadas, possivelmente em função dos danos no sistema de membranas, inclusive mitocondriais, ocasionados pela presença do fungo *S. maydis* e/ou da taxa de difusão de oxigênio reduzida na presença do fungo, que pode ter atuado como barreira às trocas gasosas entre as sementes e o meio, propiciando um ambiente anaeróbico.

Os efeitos de tal patógeno sobre o desempenho germinativo e as características bioquímicas das sementes inoculadas sob restrição hídrica foram

constatados anteriormente por meio dos testes de germinação e vigor (primeira contagem e condutividade elétrica) (Tabelas 6 e 7), dentre os quais se destacam a redução da porcentagem e da velocidade de germinação das sementes e a desorganização do sistema de membranas das células.

Com relação à isoenzima ADH2, verifica-se maior intensidade da banda (maior atividade) em sementes de milho submetidas à restrição hídrica com NaCl, na ausência do fungo, em relação aos demais tratamentos.

Vale salientar que a rápida absorção de água pelas sementes em soluções salinas, tal como verificado neste estudo (Figura 2), ocorre devido ao efeito iônico de soluções de NaCl sobre a permeabilidade do sistema de membranas, tendo em vista que o íon Na^+ é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana e reduzir a seletividade da absorção (Ashraf & O'Leary, 1997). Nesse sentido, a maior atividade da ADH2 em sementes condicionadas osmoticamente com NaCl, na ausência do fungo (que também compete pela absorção da solução de embebição), pode ser resultante de danos no sistema de membranas ocasionados pela rápida absorção de água, em adição aos efeitos tóxicos da salinidade.

Os efeitos da salinidade sobre o desempenho germinativo e características bioquímicas das sementes foram constatados anteriormente por meio dos testes de germinação e vigor (primeira contagem e condutividade elétrica) (Tabelas 4 e 7), sendo este restritor altamente prejudicial às sementes em embebição.

Algumas enzimas pertencem ao grupo das oxidorreduções, como a peroxidase (PO) e a superóxido dismutase (SOD), as quais atuam como mecanismos antioxidantes, removedoras de produtos tóxicos (*scavengers*), protegendo as células contra a ação de diversas formas de oxigênios ativos, uma vez que são capazes de neutralizar a atuação dos radicais livres na degradação de membranas (Marcos Filho, 2005).

A atividade das isoenzimas de SOD não diferiu entre os tratamentos (Figura 5C), não sendo alterada em condições de restrição hídrica e associação fungo/semente.

A catalase é uma enzima envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio (tóxico), prevenindo danos oxidativos (Fridovich, 1986). Embora seja uma enzima constitutiva, sua atividade pode ser induzida sob condições de estresse, daí a presença em sementes de todos os tratamentos inclusive o controle.

A atividade da catalase não diferiu entre os tratamentos com exceção da restrição hídrica com NaCl na presença do fungo, sendo reduzida nessas condições (Figura 5D). Tendo em vista que estas foram as condições de estresse mais drásticas, verificadas pela maior incidência do fungo em sementes sob estresse hídrico/salino (Figura 4), a atividade da catalase pode ter sido reduzida em decorrência de uma alteração metabólica associada ao processo de deterioração das sementes.

A atividade das enzimas removedoras de radicais livres foi estudada por Rosa et al. (2005), que investigaram o padrão eletroforético da SOD, catalase e peroxidase em sementes de milho tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem, observando que a atividade da SOD e a da peroxidase foram semelhantes, não apresentando diferenças detectáveis entre os tratamentos de pré-condicionamento. Porém, pôde-se observar um aumento da atividade da catalase nas sementes tolerantes à secagem. Provavelmente, a enzima catalase removeu peróxidos de hidrogênio produzidos por outras enzimas como a SOD, protegendo as células desses compostos, nas sementes tolerantes.

A enzima esterase (EST) participa de reações de hidrólise de ésteres e, portanto, atua diretamente no metabolismo dos lipídios.

Nas sementes submetidas à restrição hídrica com NaCl e manitol – solutos que penetram nas células do embrião durante a absorção de água -, a

atividade de algumas isoenzimas de EST (bandas superiores) foi reduzida com a presença do fungo (Figura 5E). A redução da atividade das isoenzimas de esterase, verificada pela redução da intensidade das bandas, pode estar relacionada com a perda da integridade do sistema de membranas (Givelberg et al., 1984; Machado, 2000) possivelmente ocasionada pelo estresse salino, sendo as sementes mais suscetíveis à ação do patógeno nessas condições.

Resultados semelhantes foram obtidos por Padilha et al. (2001), em cujo trabalho a intensidade de bandas para tal enzima foi reduzida em sementes de milho submetidas a estresses mais drásticos.

Em contrapartida, nas sementes submetidas à restrição hídrica com PEG – polímero de alto peso molecular que não penetra nas células -, verificou-se um aumento da atividade das isoenzimas de EST com a presença do fungo (Figura 5E). Nessa circunstância, a atividade das enzimas de EST pode ter sido alterada em função da ação do fungo associado às sementes, indicando que tais sementes apresentavam maior peroxidação de seus lipídios de membrana e, portanto, em estágio de deterioração mais avançado em relação às sementes não inoculadas.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Santos et al. (2004) com sementes de feijão envelhecidas, em que a atividade da enzima de EST aumenta com o progresso da deterioração, sendo reduzida sob condições drásticas de estresse.

Tendo em vista que a atividade das isoenzimas de EST pode ser determinada pelo grau de deterioração das sementes, com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a restrição hídrica com PEG 6000 permitiu maior controle do avanço do processo de deterioração das sementes em relação à restrição hídrica com NaCl e manitol. Tal fato pode ser atribuído às características do agente osmótico PEG 6000, polímero atóxico que não penetra nas células, em adição à absorção lenta de água pelas sementes nessas condições, permitindo maior tempo para o reparo ou reorganização das

membranas e, com isso, redução de injúrias durante a embebição. Consequentemente, a incidência do fungo foi menor em tais sementes (Figura 4).

A ausência da banda superior da enzima EST em sementes não tratadas (controle) indica a indução de sua atividade sob condições de estresse hídrico.

Ribeiro (2000), trabalhando com sementes de algodão, observou que durante o condicionamento fisiológico, houve variação na atividade das enzimas álcool desidrogenase e esterase, porém, os padrões permaneceram inalterados para as enzimas glutamato desidrogenase e catalase.

4.4 Estabelecimento da curva de embebição de sementes de soja, submetidas à restrição hídrica, na presença e na ausência do fungo *Colletotrichum truncatum*

A marcha de absorção de água em sementes de soja submetidas à restrição hídrica na presença e na ausência do fungo *Colletotrichum truncatum* pode ser observada nas Figuras 6, 7 e 8.

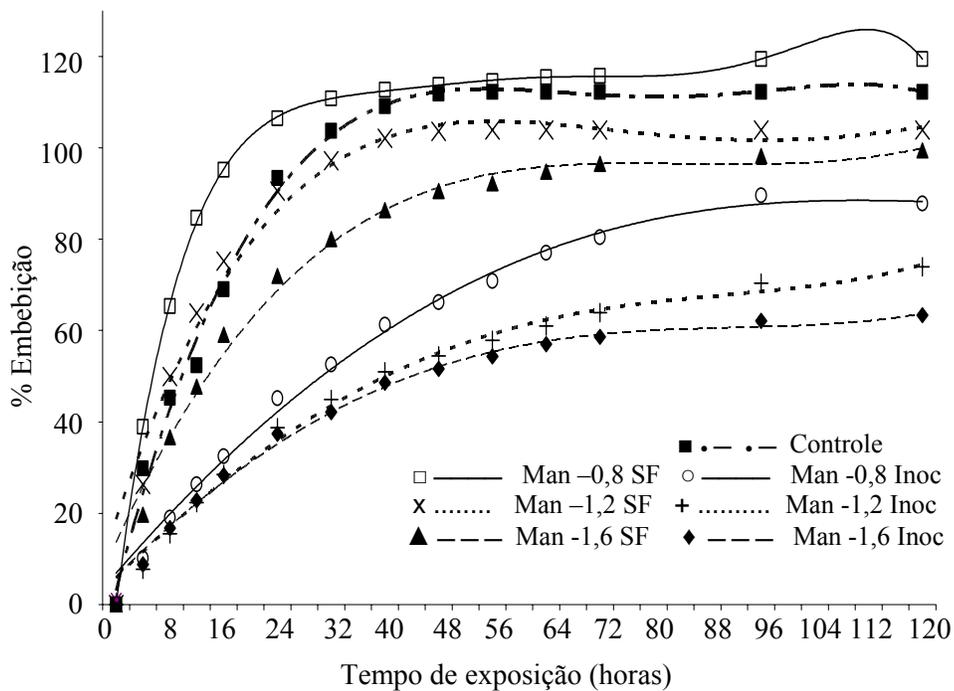


FIGURA 6 Padrão de absorção de água em sementes de soja, sob diferentes níveis de restrição hídrica com manitol, na presença (Inoc) e na ausência (SF) do fungo *Colletotrichum truncatum*.

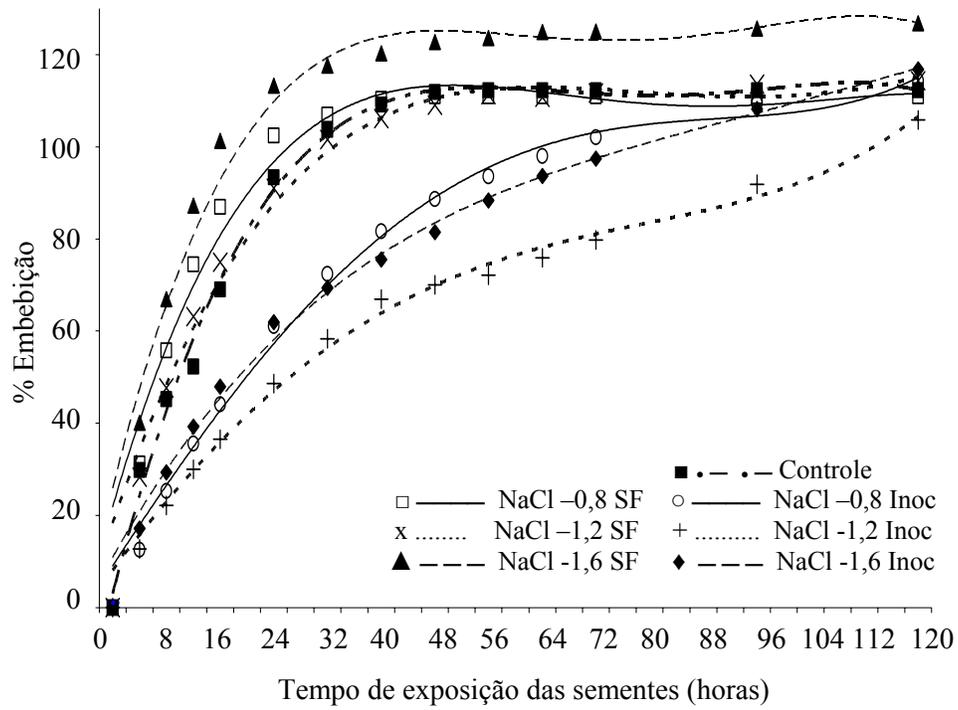


FIGURA 7 Padrão de absorção de água em sementes de soja, sob diferentes níveis de restrição hídrica com NaCl, na presença (Inoc) e na ausência (SF) do fungo *Colletotrichum truncatum*.

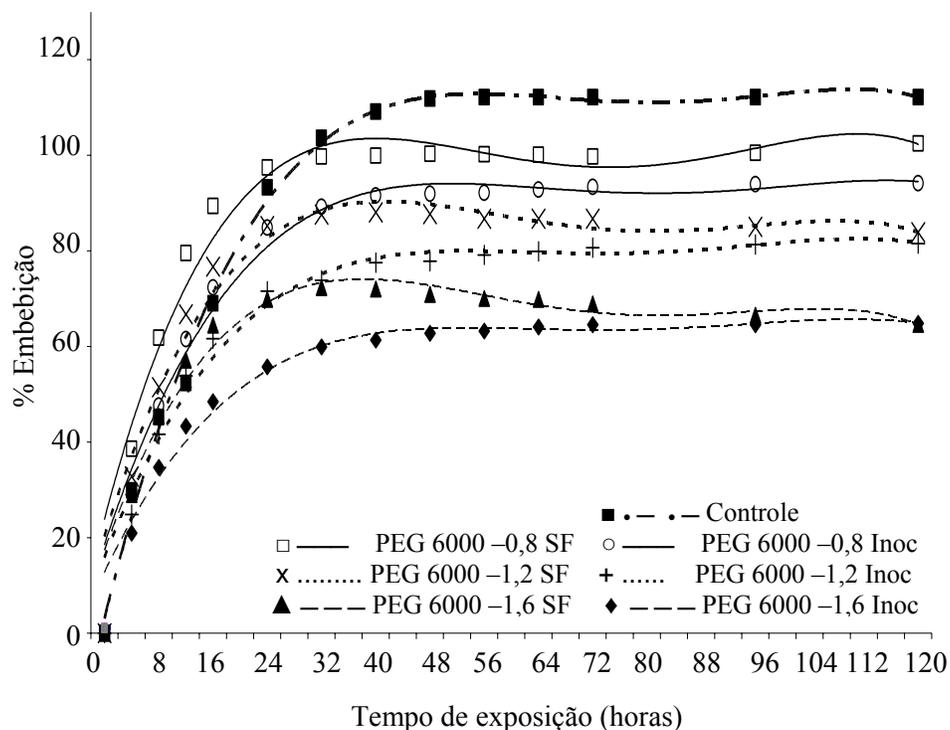


FIGURA 8 Padrão de absorção de água em sementes de soja, sob diferentes níveis de restrição hídrica com PEG 6000, na presença (Inoc) e na ausência (SF) do fungo *Colletotrichum truncatum*.

A marcha de absorção de água em sementes de soja, sob restrição hídrica e na presença do fungo *Colletotrichum truncatum*, foi acompanhada durante as Fases I e II até o início da Fase III de embebição, momento em que ocorre a protrusão da radícula. Com base nos resultados, ficou evidente que a embebição foi distinta, tendo a redução do potencial hídrico induzido pelos restritores utilizados e a presença de *C. truncatum* no substrato de papel reduzido a absorção de água e a protrusão radicular das sementes de soja. Provavelmente, a presença do fungo no substrato pode ter favorecido a redução do potencial hídrico do meio, devido à absorção de água durante seu desenvolvimento.

De modo geral, observou-se que, na embebição das sementes expostas ao substrato umedecido com manitol, na ausência do fungo *C. truncatum*, o final da Fase I foi concluído em torno de 24 horas para o potencial hídrico -0,8 MPa e, para os potenciais -1,2 MPa e -1,6 MPa, foi em torno de 40 horas. Na presença do patógeno, o final desta fase foi concluído em torno de 48 horas para todos os potenciais hídricos estudados e, no caso da testemunha, foi em torno de 32 horas de exposição ao substrato umedecido.

Em relação ao restritor NaCl, a Fase I foi concluída em torno de 40 horas para todos os potenciais hídricos na ausência do fungo e, em torno de 48 horas na presença deste. O restritor PEG 6000 foi mais estável, concluindo o final da Fase I em torno de 32 horas, para todos os potenciais hídricos estudados, independente da presença do patógeno.

No que diz respeito à duração da Fase II de embebição das sementes de soja, esta foi prolongada na presença do fungo e à medida que reduziu o potencial hídrico do substrato. Isso pode ser observado na Tabela 8, na qual são apresentados os dados referentes ao tempo que antecede a emissão radicular das sementes, ou seja, o final da Fase II de embebição.

Os teores de água e os tempos que antecedem a protrusão radicular das sementes de soja, submetidas à restrição hídrica, durante a embebição, na presença e na ausência de *C. truncatum*, estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 Tempo (h) que antecede a protrusão (TP₀) e umidade de sementes de soja submetidas à restrição hídrica, durante a embebição, na presença e na ausência de *Colletotrichum truncatum*.

Tratamento	Manitol		NaCl		PEG 6000		
	S/Fungo	C/Fungo	S/Fungo	C/Fungo	S/Fungo	C/Fungo	
-0,8 MPa	TP ₀	40	72	32	64	48	SP
	Umidade	54,54	52,38	55,65	56,81	54,14	55,90
-1,2 MPa	TP ₀	56	SP	48	SP	SP	SP
	Umidade	56,97	50,73	55,61	58,06	49,38	52,87
-1,6 MPa	TP ₀	SP	SP	SP	SP	SP	SP
	Umidade	53,92	47,45	59,11	60,50	43,73	48,09
TEST	TP ₀	32					
	Umidade	49,24					

SP = sem protrusão até 120 horas; S/Fungo = sem fungo; C/Fungo = com fungo

Em uma análise geral do teor de água das sementes, observa-se que, no período que antecede a protrusão radicular (TP₀), as sementes encontram-se com umidade na faixa de 52 a 57%. Vale ressaltar que, para nenhum dos restritores houve emissão de radícula no potencial hídrico -1,6 MPa, embora, em alguns casos, nesse potencial, a semente tenha atingido a umidade dentro da faixa citada acima (Tabela 8). Talvez essa inibição possa ter ocorrido pela redução do potencial hídrico, bem como por algum efeito fitotóxico do restritor à semente.

Em estudos sobre a marcha de absorção de água de sementes de soja (Villela et al., 2007), constataram-se teores de água em torno de 52 e 53% suficientes para possibilitar a emissão da raiz primária. Sementes nas quais predominam reservas cotiledonares atingem, no início da protrusão radicular, teores de água na faixa de 50 a 60% (Marcos Filho, 2005).

De acordo com Bradford (1986), a protrusão radicular está relacionada à obtenção de um nível mínimo de umidade na semente durante a Fase II que praticamente estabiliza-se, até o momento exato da emissão da radícula (Fase III).

Com base na Tabela 8, pode-se observar que a variação no tempo que antecede o início da emissão da radícula (TP₀) ocorreu em função do potencial hídrico do substrato e da presença do fungo *C. truncatum*. Na presença do mesmo, observou-se maior tempo para início da protrusão radicular, à medida que o potencial hídrico reduziu.

Pode-se constatar que, para as sementes de soja, os solutos utilizados tiveram maior ação restritora, ou seja, foi possível manter as sementes por um maior tempo em contato com os restritores e o patógeno, sem ocorrer protrusão radicular.

De acordo com a literatura, a protrusão radicular de sementes de soja e feijão foi inibida em função da redução da restrição hídrica utilizando manitol a -1,0 MPa e, dessa forma, possibilitou a exposição das sementes por até 120 horas, em contato com os fungos em estudo. Da mesma forma, solução NaCl a -1,0 MPa foi eficaz para prolongar o tempo que daria início a emissão de radícula de sementes de soja, bem como PEG 6000 no potencial hídrico -1,0 MPa, em sementes de feijão (Carvalho, 1999; Machado et al., 2001b, 2003).

Conforme já mencionado anteriormente, visando o teste de sanidade, os estudos de germinação de sementes são de interesse para várias espécies. No caso das dicotiledôneas, a restrição hídrica pode ser utilizada com essa finalidade, como um método alternativo ao uso do 2,4-D.

Neste caso, o ensaio de embebição das sementes de soja até 120 horas, na ausência do fungo *Colletotrichum truncatum*, serviu de apoio para estudar os efeitos da restrição hídrica sobre a germinação de sementes.

Assim, os efeitos da restrição hídrica sobre a germinação das sementes de soja, expostas ao substrato umedecido com restritor, por um período de 120 horas, podem ser verificados na Tabela 9.

TABELA 9 Porcentagem de sementes de soja germinadas (comprimento da raiz primária maior ou igual à dimensão da semente) durante a embebição, sob restrição hídrica e na ausência de *Colletotrichum truncatum*, por um período de 120 horas.

Tratamento	Manitol	NaCl	PEG 6000
-0,8 MPa	80	100	10
-1,2 MPa	20	0	0
-1,6 MPa	0	0	0
TEST	90		

A porcentagem de sementes de soja germinadas referentes aos tratamentos de restrição hídrica foi reduzida à medida que diminuiu o potencial hídrico.

No potencial hídrico -0,8 MPa, a menor porcentagem do comprimento de radícula foi verificada para o tratamento com PEG 6000, apresentando apenas 10% de sementes com comprimento radicular semelhante à dimensão da semente. Já os potenciais -1,2 MPa e -1,6 MPa foram eficazes em reduzir o comprimento da raiz seminal, para todos os restritores estudados.

Assim, com base nestes resultados, pode-se considerar que a utilização da técnica de restrição hídrica, sob este aspecto, é favorável para o teste de sanidade, por inibir e/ou reduzir a germinação de sementes de soja, evitando contaminações secundárias entre as mesmas, durante o período de incubação, além de facilitar o exame das sementes em microscópio estereoscópio,

possibilitando maior segurança na detecção dos fungos desenvolvidos sobre as mesmas.

Em outros estudos, foram avaliados os efeitos dos restritores manitol e NaCl, na germinação de sementes de algodão durante o teste de incubação em substrato de papel e foi possível observar que a maior redução da raiz seminal ocorreu no potencial hídrico -1,2 MPa, para os dois solutos avaliados (Machado et al., 2007).

4.5 Desempenho das sementes de soja submetidas à restrição hídrica, na presença e ausência do fungo *Colletotrichum truncatum*

Os resultados de germinação e vigor de sementes de soja inoculadas ou não, sob condições de restrição hídrica constam na Tabela 10.

TABELA 10 Valores médios da porcentagem de germinação, primeira contagem e condutividade elétrica de sementes de soja, submetidas à restrição hídrica à -1,2 MPa, inoculadas ou não com *Colletotrichum truncatum*.

Tratamento	% Germinação		1ª Contagem		Condutividade Elétrica	
	S/Fungo	C/Fungo	S/Fungo	C/Fungo	S/Fungo	C/Fungo
PEG 6000	45aA*	30aB*	45aA*	30aB*	128,4aA*	149,0aB*
Manitol	44aA*	16bB*	44aA*	16bB*	147,6bA*	182,0bB*
NaCl	33bA*	18bB*	33bA*	18bB*	266,3cA*	287,2cB*
Testemunha	87		82		106,79	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$). * Diferem significativamente da testemunha pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$).

De modo geral, todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha, para todos os parâmetros avaliados (Tabela 10), evidenciando a sensibilidade das sementes de soja aos efeitos da restrição hídrica, independente da presença do fungo *C. truncatum*.

Em relação ao efeito dos restritores, houve redução na porcentagem de germinação e primeira contagem, quando as sementes foram condicionadas com NaCl, na ausência do fungo. Já para as sementes inoculadas sob condicionamento, houve redução quando utilizou manitol, além do NaCl.

Como já observado, o NaCl mesmo na ausência do fungo, tem efeito negativo sobre a qualidade das sementes de soja, bem como para as de milho. Porém, as sementes de soja foram mais sensíveis ao condicionamento com manitol, sendo esta evidenciada quando as sementes foram inoculadas, ou seja, a utilização deste soluto somada à presença do patógeno teve efeito negativo sobre a porcentagem de germinação e vigor (primeira contagem) das sementes. Este resultado está de acordo com aqueles obtidos no teste de condutividade elétrica, onde o condicionamento com manitol, em sementes inoculadas ou não, mostrou-se intermediário ao PEG 6000 e NaCl.

Quanto ao efeito do patógeno nas sementes em relação a cada restritor, individualmente, observa-se que o fungo *C. truncatum* teve efeito significativo na qualidade das sementes de soja, ocasionando baixa germinação e vigor, para todos os tratamentos de condicionamento. Caso semelhante ocorreu em estudos com este patossistema utilizando solução de manitol à -1,0 MPa (Machado et al., 2001a).

Os resultados referentes à incidência de *Colletotrichum truncatum* detectado nas sementes de soja inoculadas sob restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e PEG 6000 estão apresentados na Figura 9.

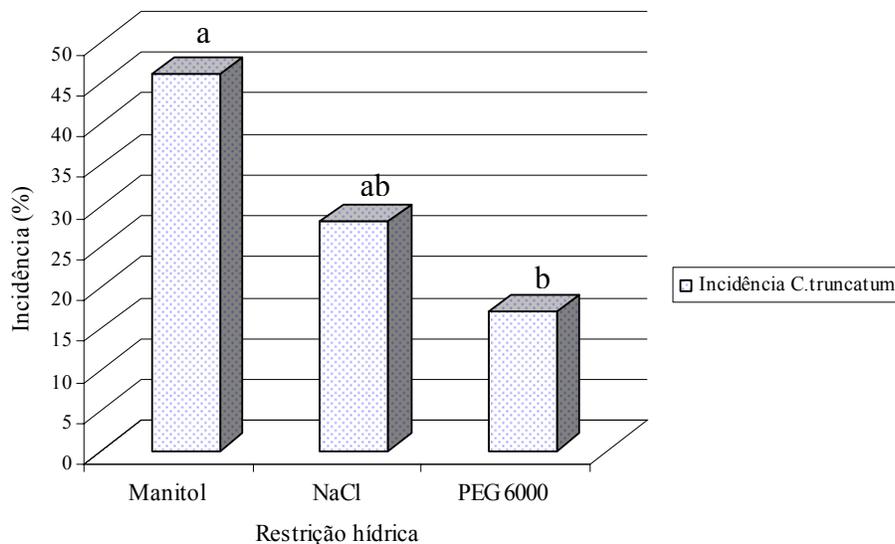


FIGURA 9 Incidência (%) de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja inoculadas sob restrição hídrica à -1,2 MPa.

A técnica de restrição hídrica induzida pelos solutos manitol, NaCl e PEG 6000, no potencial hídrico -1,2 MPa permitiu inocular sementes de soja com o fungo *C. truncatum*, por um período de até 120 horas.

A incidência de *C. truncatum* nas sementes de soja foi verificada por meio do teste de sanidade, em que foi possível observar que a maior incidência do patógeno foi favorecida quando se utilizou manitol, enquanto que o PEG 6000 proporcionou a menor porcentagem de infecção (Figura 9). Em contrapartida, sementes inoculadas com *C. truncatum*, sob restrição hídrica com manitol, tiveram redução na germinação e vigor, diferindo significativamente das inoculadas com PEG 6000, evidenciando o efeito desse patógeno na qualidade das sementes (Tabela 10).

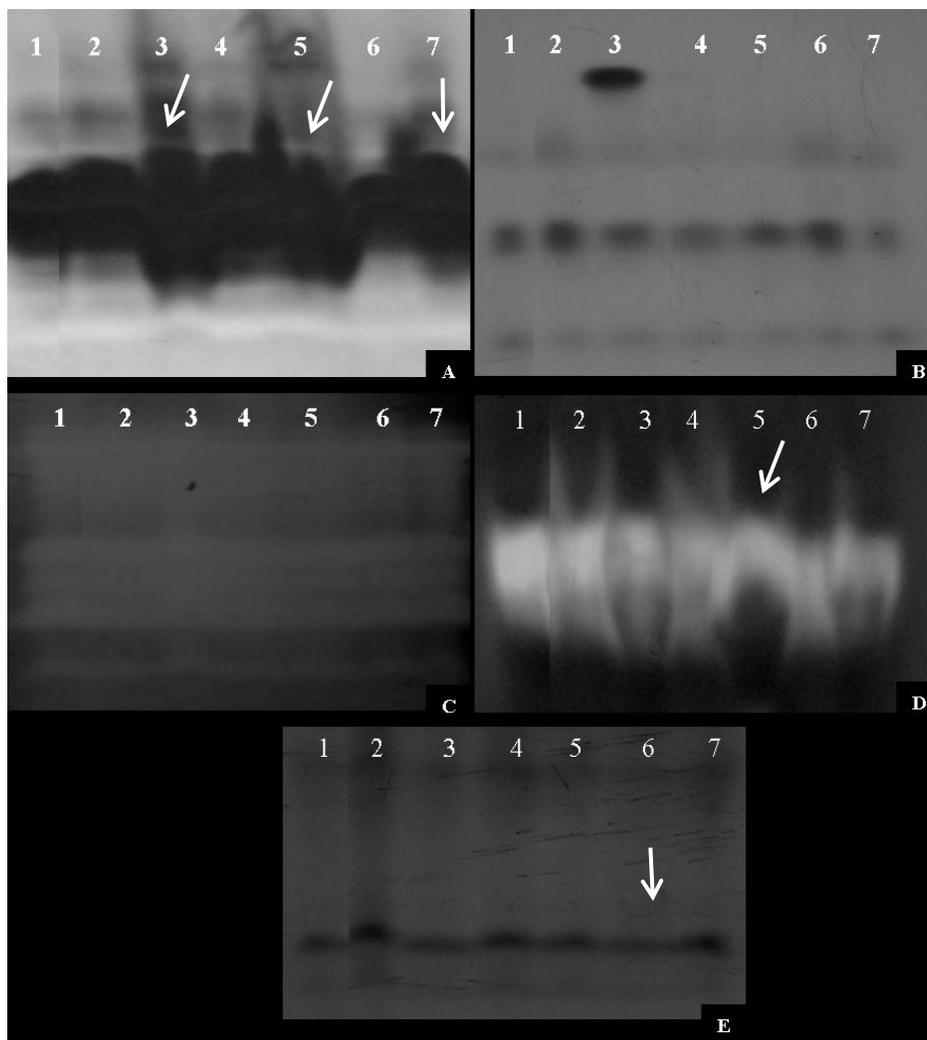
Em estudos sobre os efeitos da restrição hídrica do substrato induzida por manitol e PEG 6000, sob o desenvolvimento de *C. lindemuthianum*, pode-se observar que o soluto manitol estimulou o crescimento do fungo ao passo que o PEG 6000 restringiu o desenvolvimento do mesmo (Carvalho et al., 2001).

De acordo com literatura, a técnica de restrição hídrica tem-se mostrado viável para inocular sementes de soja, uma vez que é possível manter as sementes em contato com o fungo por um período maior de tempo, sem que ocorra a protrusão radicular, obtendo assim, maiores índices de infecção (Machado et al., 2001a).

Os efeitos da restrição hídrica também foram avaliados para o patossistema feijão x *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (*Fop*), em que verificou-se que a incidência de *Fop* foi estimulada pelos solutos utilizados durante a inoculação, afetando o desempenho das sementes (Costa et al., 2003).

4.6 Padrões eletroforéticos de sistemas enzimáticos de sementes de soja, submetidas à restrição hídrica, na presença e na ausência de *Colletotrichum truncatum*

Os sistemas enzimáticos das sementes de soja submetidas à restrição hídrica, na presença e na ausência de *Colletotrichum truncatum*, revelados para malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e esterase (EST), podem ser observados na Figura 10.



1: Controle (sementes não condicionadas/inoculadas, 0 h); 2: Manitol -1,2 MPa (não inoculado 56 h); 3: Manitol -1,2 MPa (inoculado 120 h); 4: NaCl -1,2 MPa (não inoculado 48 h); 5: NaCl -1,2 MPa (inoculado 120 h); 6: PEG 6000 -1,2 MPa (não inoculado 120 h); 7: PEG 6000 -1,2 MPa (inoculado 120 h).

FIGURA 10 Padrões eletroforéticos das enzimas malato desidrogenase (A), álcool desidrogenase (B), superóxido dismutase (C), catalase (D) e esterase (E) em sementes de soja submetidas à restrição hídrica, na presença e na ausência do fungo *Colletotrichum truncatum*.

De modo geral, a atividade da MDH em sementes de soja aumentou com a presença do fungo *Colletotrichum truncatum* (Figura 10A). Vale ressaltar que, dentre os fatores que determinam os resultados do condicionamento fisiológico destacam-se o genótipo, condição inicial das sementes (grau de deterioração), composição química das sementes, permeabilidade da cobertura; daí as respostas distintas à restrição hídrica das sementes de milho e soja.

Tendo em vista o efeito prejudicial deste patógeno sobre o desempenho fisiológico das sementes de soja (Tabela 10), a maior atividade da enzima MDH nas sementes submetidas à restrição hídrica na presença do fungo, provavelmente, deveu-se ao aumento da taxa de respiração e à velocidade de deterioração das sementes decorrente do aquecimento das sementes nessas condições.

Em sementes de milho associadas aos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp., observou-se redução na qualidade fisiológica das sementes, possivelmente pela interferência dos referidos fungos no metabolismo das sementes, propiciando alterações nos padrões isoenzimáticos da álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato oxalacetato transaminase (Silva et al., 2000).

A enzima ADH, por sua vez, não apresentou um padrão de resposta às condições de restrição hídrica e/ou associação fungo/semente (Figura 10B), não permitindo inferências sobre o estado metabólico das sementes ou resposta aos diferentes tratamentos, neste caso particular.

A atividade das isoenzimas de SOD não diferiu entre os tratamentos (Figura 10C), não sendo alterada em condições de restrição hídrica e associação fungo/semente, evidenciando a estabilidade da enzima nas condições testadas neste estudo.

Os padrões enzimáticos de catalase em sementes de soja (Figura 10D) foram semelhantes àqueles observados em sementes de milho (Figura 5D), sendo a atividade desta enzima reduzida em sementes submetidas à restrição hídrica com NaCl em decorrência do estresse hídrico/salino associado à presença do patógeno.

Da mesma forma, os padrões enzimáticos de EST em sementes de soja (Figura 10E) foram semelhantes àqueles observados em sementes de milho (Figura 5E), embora não tão pronunciado. Assim, em sementes de soja embebidas em soluções de NaCl e manitol, a atividade das isoenzimas de EST foi reduzida com a presença do fungo, ao passo que, em sementes embebidas em solução de PEG 6000, houve um aumento da atividade das isoenzimas com a presença do fungo, evidenciando a resposta da EST a condições de estresse em função do grau de deterioração das sementes.

De acordo com a literatura, alterações nos padrões da enzima esterase podem evidenciar a ocorrência de eventos deteriorativos, principalmente nos maiores níveis de atividade, uma vez que essa enzima está envolvida em reações de hidrólise de ésteres (Santos et al., 2005).

Chauhan et al. (1985), estudando variação eletroforética de enzimas de soja e cevada em relação à qualidade das sementes, observaram que bandas de enzimas esterases, fofatase e transaminases funcionam como marcadores moleculares na avaliação da qualidade.

5 CONCLUSÕES

- O padrão de embebição de sementes de milho e soja, sob condições de restrição hídrica em substrato de papel, segue, basicamente, o mesmo padrão de embebição de sementes na ausência de restrição hídrica, porém, com valores inferiores durante o período de avaliação realizado, até o início da Fase III;
- Na presença dos fungos *Stenocarpella maydis* e *Colletotrichum truncatum* no substrato de papel com restrição hídrica, as sementes de milho e soja apresentam menor porcentagem de embebição, durante as Fases I e II, comparado com a embebição na ausência desses patógenos;
 - A qualidade das sementes de milho, na ausência de *S. maydis*, não é influenciada pelos restritores manitol e PEG 6000, ao passo que o restritor NaCl provoca efeitos negativos na germinação e no vigor; na presença de *S. maydis* a qualidade de sementes de milho é afetada, sob todas as condições de restrição hídrica.
 - Em relação às sementes de soja todos os restritores hídricos provocam efeitos negativos na qualidade das sementes, independente da presença de *C. truncatum*; entre os restritores estudados, o NaCl é o mais prejudicial e, na presença do fungo nos tecidos das sementes, esse efeito na qualidade é mais pronunciado.
 - Por estes estudos fica evidente que o uso da restrição hídrica com manitol configura-se como o mais adequado para estudos de interação entre sementes e fungos fitopatogênicos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações advindas deste estudo deixam claro que a escolha do restritor e o seu potencial hídrico, com o intuito de inocular sementes com fungos, como *Stenocarpella maydis* em milho e *Colletotrichum truncatum* em soja, deve ser determinada para cada espécie.

Da maneira como o condicionamento das sementes é realizado para alcançar níveis mais elevados de infecção pelos fungos, pela técnica de restrição hídrica, alguns restritores, como NaCl, podem causar efeitos danosos à qualidade das sementes e outros, como manitol e PEG 6000, não interferem significativamente no desempenho das sementes inoculadas.

Embora os valores das variáveis utilizadas neste estudo tenham indicado diferenças entre tratamentos com restrição e sem restrição hídrica, na presença e na ausência dos fungos, foi evidenciado que o uso da tecnologia de restrição hídrica possibilita obter sementes com níveis variáveis de infecção por estes patógenos de forma satisfatória para o seu uso em estudos diversos em patologia de sementes. O importante desta tecnologia é a possibilidade de se obter sementes infectadas com diferentes potenciais de inóculo, constituindo, desta forma, um procedimento que pode reproduzir, com alto grau de precisão, o que ocorre em lotes de sementes de forma natural.

Com base nos valores de embebição registrados, viu-se que a absorção de água pelas sementes na presença dos fungos, previamente desenvolvidos no substrato de papel com restrição hídrica, é menor e faz com que o potencial hídrico do substrato seja reduzido. Neste caso, o período de contato entre sementes e colônia fúngica é maior e sem que haja protrusão radicular.

Outro aspecto de interesse observado neste estudo foi o fato de que houve comportamento diferenciado entre os dois fungos utilizados, considerando as mesmas condições de restrição hídrica. Para um mesmo soluto e

o potencial hídrico, *Colletotrichum truncatum* foi mais danoso às sementes de soja em comparação com *Stenocarpella maydis* em sementes de milho.

Do ponto de vista de aplicação prática, a presença dos patógenos selecionados junto às sementes de seus hospedeiros, no caso milho e soja, sob condições iniciais de estresse hídrico, provocado por diferentes restritores, constitui fator importante na redução do percentual de germinação e vigor das sementes, o que equivale à redução de estande em condições de plantio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, K.S. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da maturação de sementes de pimentão**. 2009. 120p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALFENAS, A.C.; PETRES, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242p.

AMARAL, E.A.S.; VIEIRA, M.G.G.C.; SANTOS, C.D. Avaliação da influência de diferentes potenciais osmóticos no índice de crescimento de *Fusarium moniliforme* Sheldon, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em meio de cultura. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 15.; WORKSHOP SOBRE MARKETING EM SEMENTES E MUDAS, 3., 1996, Gramado. **Anais...** Gramado: CESM-RS/FELAS, 1996. p.93. (Resumo, 157).

ARAÚJO, D.V.; POZZA, E.A.; MACHADO, J.C.; ZAMBENEDETTI, E.B.; CELANO, F.A.O.; CARVALHO, E.M.; CAMARGOS, V.N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.1, p.35-40, jan./fev. 2006.

ASHRAF, M.; O'LEARY, J.W. Responses of a salt-tolerant and a salt-sensitive line of sunflower to varying sodium/calcium ratios in saline sand culture. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v.20, n.2/3, p.361-377, Sept. 1997.

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

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

BRANDÃO JÚNIOR, D. da S. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.).

Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1158-1203.

BROWNELL, K.H.; SCHNEIDER, 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**, Saint Paul, v.75, n.1, p.53-57, Jan. 1985.

CARVALHO, E.M.; MACHADO, J.C.; PINHO, E.V.R. von; POZZA, E.A.; PRADO, P.E.R. Relação do tamanho da sementes de milho e doses de fungicida no controle de *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.389-393, jul./ago. 2004.

CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.4, p.999-1005, jul./ago. 2001.

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

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.5, p.427-439, set./out. 2006.

CELANO, F.A.O. **Desempenho de sementes de algodão durante o armazenamento, após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica de restrição hídrica**. 2004. 83p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CELANO, M.M. **Uso da restrição hídrica em teste de sanidade e em estudos sobre a interação entre fungos e sementes de trigo**. 2003. 91p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CHAUAN, K.P.S.; GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.3, p.629-641, 1985.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A.S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1995. p.223-275.

COSTA, M.L.N. **Inoculação de *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* em sementes de feijoeiro por meio da restrição hídrica**. 2000. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

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

COUTINHO, W.M.; MACHADO, J. da C. **Restrição hídrica: uma nova metodologia para controlar germinação de sementes em testes de sanidade**. Londrina: ABRATES, 2002. Disponível em: <<http://www.patologiadeseementes.com.br>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

COUTINHO, W.M.; MACHADO, J. da C.; VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; FERREIRA, D.F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.127-135, mar./abr. 2001.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v.33, p.9-13, 1967.

- FREITAS, M.A. **Variabilidade, danos e detecção de *Stenocarpella macrospora* em sementes de milho**. 2006. 165p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.247, n.1, p.1-11, Jan. 1986.
- GIVELBERG, A.; HOROWITZ, M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Solute leakage from *Solanum nigrum* L. seeds exposed to high temperatures during imbibition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.35, n.12, p.1754-1763, Dec. 1984.
- IMOLESI, A.S. **Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho**. 1999. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- KONAREV, V.G. Proteins in cultivar identification. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 3., 1987, Leningrad. **Proceedings...** Leningrad: ISTA, 1988. p.9-14.
- KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.
- MACHADO, A.Q. **Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro**. 2002. 55p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MACHADO, A.Q.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; SOUZA, M.V. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.5, p.408-414, set./out. 2007.
- MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.
- MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; SOUZA, R.M. Use of water restriction technique in seed pathology. In: SEED PAROLOGY SYMPOSIUM ON SEED PATHOLOGY, 4., 2002, Zurich. **Proceedings...** Zurich: ISTA, 2002. p.15.

MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J. General incubation methods for routine seed health analysis. In: MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J.; JACCOUD-FILHO, D.S. (Ed.). **Seed-borne fungi**: a contribution to routine seed health analysis. Bassersdorf: ISTA, 2002. p.48-80.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. 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, mar./abr. 2003.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.95-101, mar./abr. 2001a.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.84-94, mar./abr. 2001b.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. 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, jan./mar. 2004.

MACHADO, J.C.; POZZA, E.A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p.375-398.

MAGALHÃES, F.H.L. **Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações**. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

MAUDE, R.B. **Seed-borne diseases and their control: principles and practices**. Wallingford: CAB International, 1996. 280p.

McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.27, n.1, p.177-237, Feb. 1999.

McDONALD, M.B.; SULLIVAN, J.; LAUER, M.J. The pathway of water uptake in maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.22, n.1, p.79-90, Mar. 1994.

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.131-136, Jan./Feb. 1995.

PADILHA, L.; VIEIRA, M.G.G.C.; PINHO, E.V.R. von; CARVALHO, M.L.M. Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.1, p.198-204, jan./mar. 2001.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

RIBEIRO, U.P. **Restrição hídrica de sementes de algodão**: efeito sobre a germinação, vigor, atividade enzimática e armazenabilidade. 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RIBEIRO, U.P.; PINHO, E.V.R. von; GUIMARÃES, R.M.; VIANA, L.S. Determinação do potencial osmótico e do período de embebição utilizados no condicionamento fisiológico de sementes de algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.911-917, set./out. 2002.

ROSA, S.V.F.; PINHO, E.V.R. von; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *LEA* associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.27, n.2, p.91-101, abr./jun. 2005.

ROSSETTO, C.A.V.; NOVENBRE, A.D.L.C.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R.; NAKAGAWA, J. Comportamento das sementes de soja durante a fase inicial do processo de germinação. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.1/2, p.106-115, jan./abr. 1997.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.26, n.1, p.110-119, jan./mar. 2004.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.27, n.1, p.104-114, jan./mar. 2005.

SILVA, E.A.M.; PINHO, E.V.R. von; VIEIRA, M.G.G.C.; CARVALHO, M.L.M.; MACHADO, J.C. Alterações dos padrões isoenzimáticos em sementes de milho infectadas por fungo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.9, p.1725-1732, set. 2000.

SILVA, P.A. **Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultraestrutural durante o desenvolvimento e a secagem de semente de soja**. 2006. 56p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUSA, M.V.; MACHADO, J.C.; PFENNING, L.H.; KAWASAKI, V.H.; ARAÚJO, D.V.; SILVA, A.A. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.1, p.41-48, jan./fev. 2008.

SPINOLA, M.C.M.; CÍCERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.2, p.263-270, abr./jun. 2000.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J.C.; ORIDE, D.; ALVES, M.C.; NODA, A. Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infetadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.2, p.109-114, mar./abr. 2005.

TIMÓTEO, T.S. **Condicionamento e qualidade de sementes de milho no sincronismo do florescimento em campo de produção de sementes híbridas**. 2007. 83p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TOBE, K.; LI, X.; OMASA, K. Seed germination and radicle growth of a halophyte, *kalidium caspicum* (*Chenopodiaceae*). **Annals of Botany**, London, v.85, n.3, p.391-396, Mar. 2000.

VIEIRA, E.S.N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 2004. 137f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VIEIRA, M.G.C.G. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 127p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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, nov./dez. 1991.

VILLELA, F.A.; MARCOS-FILHO, J.; NOVENBRE, A.D.L.C. Estado energético da água na semente de milho no processo de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.25, n.1, p.95-100, jan./mar. 2003.

VILLELA, F.A.; NOVENBRE, A.D.L.C.; MARCOS FILHO, J. Estado energético da água na germinação de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.1, p.27-34, jan./mar. 2007.

ANEXOS

	Página
TABELA 1A	
Análise de variância dos dados da 1º primeira contagem do teste de germinação de sementes de milho submetidas à restrição hídrica na presença e ausência do fungo <i>Stenorcapella maydis</i>	71
TABELA 2A	
Análise de variância dos dados do teste de germinação de sementes de milho submetidas à restrição hídrica na presença e ausência do fungo <i>Stenorcapella maydis</i>	71
TABELA 3A	
Análise de variância dos dados de condutividade elétrica de sementes de milho submetidas à restrição hídrica na presença e ausência do fungo <i>Stenorcapella maydis</i>	71
TABELA 4A	
Análise de variância dos dados de incidência de <i>Stenorcapella maydis</i> em sementes de milho inoculadas sob restrição hídrica à -1,2 MPa.....	71
TABELA 5A	
Análise de variância dos dados da 1º primeira contagem do teste de germinação de sementes de soja submetidas à restrição hídrica na presença e ausência do fungo <i>Colletotrichum truncatum</i>	72
TABELA 6A	
Análise de variância dos dados do teste de germinação de sementes de soja submetidas à restrição hídrica na presença e ausência do fungo <i>Colletotrichum truncatum</i>	72

TABELA 7A Análise de variância dos dados de condutividade elétrica de sementes de soja submetidas à restrição hídrica na presença e ausência do fungo *Colletotrichum truncatum*..... 72

TABELA 8A Análise de variância dos dados de incidência de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja inoculadas sob restrição hídrica à -1,2 MPa..... 72

TABELA 1A

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	F tab.
Restritor	2	1032,33	516,16	20,22	3,47*
Fungo	1	1232,66	1232,66	48,30	4,32*
Restritor*Fungo	2	224,33	112,16	4,39	3,47 ^{ns}
Contr, Vs Trat,	1	640,39	640,39	25,09	4,42*
erro	21	536,00	25,52		

CV(%) = 6,07; Média geral: 83,28; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}.Não significativo

TABELA 2A

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	F tab.
Restritor	2	628,00	314,00	20,55	3,47*
Trat,	1	888,16	888,16	58,12	4,32*
Restritor*Fungo	2	57,33	28,66	1,87	3,47 ^{ns}
Contr, Vs Trat	1	601,93	601,93	39,39	4,32*
erro	21	321,00	15,28		

CV(%)= 4,57 Média geral: 85,64; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}.Não significativo

TABELA 3A

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	F tab.
Restritor	2	781,25	390,62	172,84	3,47*
Fungo	1	115,84	115,84	51,26	4,32*
Restritor*Fungo	2	63,74	31,87	14,10	3,47*
Contr. Vs Trat.	1	287,59	287,59	127,25	4,32*
erro	21	47,53	2,26		

CV(%)= 4,95; Média geral:30,42; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}.Não significativo

TABELA 4A

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	Pr>Fc
Restritor	2	2336,00	1168,00	12,16	0,0028*
erro	9	864,00	96,00		

CV (%) = 24,49; Média geral: 40,00; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}.Não significativo

TABELA 5A

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	F tab.
Restritor	2	487,00	243,50	7,24	3,47*
Fungo	1	2090,66	2090,66	62,20	4,32*
Restritor*Fungo	2	270,33	135,16	4,02	3,47*
Controle vs Trat.	1	9093,43	9093,43	270,55	4,32*
erro	21	706,00	33,61		

CV (%) = 15,32; Média geral: 37,85; * Significativo a 5% de probabilidade;
^{n.s.}Não significativo

TABELA 6A

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	F tab.
Restritor	2	487,00	243,50	6,55	3,47*
Fungo	1	2090,66	2090,66	56,21	4,32*
Restritor*Fungo	2	270,33	135,16	3,63	3,47*
Controle vs Trat.	1	10752,01	10752,01	289,11	4,32*
erro	21	781,00	37,19		

CV (%) = 15,84; Média geral: 38,50; * Significativo a 5% de probabilidade;
^{n.s.}Não significativo

TABELA 7A

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	F tab.
Restritor	2	86014,07	43007,03	2151,43	3,47*
Fungo	1	3832,44	3832,44	191,72	4,32*
Restritor*Fungo	2	245,07	122,53	6,13	3,47*
Controle vs Trat.	1	25717,47	25717,47	1286,52	4,32*
erro	21	419,97	19,99		

CV(%) = 2,47; Média geral: 181,02; * Significativo a 5% de probabilidade;
^{n.s.}Não significativo

TABELA 8A

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	Pr>Fc
Restritor	2	1714,66	857,33	9,319	0,0064*
erro	9	828,00	92,00		

CV (%) = 31,62; Média geral: 30,33; * Significativo a 5% de probabilidade;
^{n.s.}Não significativo