



MANUEL ISMAEL MARTINS

**QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO E SOJA
ARMAZENADAS APÓS INOCULAÇÃO COM FUNGOS PELA
TÉCNICA DE CONDICIONAMENTO HÍDRICO**

**LAVRAS-MG
2019**

MANUEL ISMAEL MARTINS

**QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO E SOJA ARMAZENADAS APÓS
INOCULAÇÃO COM FUNGOS PELA TÉCNICA DE CONDICIONAMENTO
HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. José da Cruz Machado
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Martins, Manuel Ismael.

Qualidade de sementes de milho e soja armazenadas, após
inoculação com fungos pela técnica de condicionamento hídrico /
Manuel Ismael Martins. - 2019.

60 p. : il.

Orientador(a): José Da Cruz Machado.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Qualidade de sementes. 2. Inoculação artificial. 3.
Viabilidade fúngica. I. Machado, José Da Cruz. II. Título.

MANUEL ISMAEL MARTINS

**QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO E SOJA ARMAZENADAS APÓS
INOCULAÇÃO COM FUNGOS PELA TÉCNICA DE CONDICIONAMENTO
HÍDRICO**

**QUALITY OF STORED CORN AND SOY SEEDS AFTER FUNGAL INOCULATION
BY WATER CONDITIONING TECHNIQUE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de junho de 2019.

Dr. José da Cruz Machado UFLA

Dr. Edson Ampélio Pozza UFLA

Dr^a. Maria Luíza Nunes Costa UFMS

Prof. Dr. José da Cruz Machado
Orientador

**LAVRAS–MG
2019**

À minha querida mãe, Lurdes Salvador, aos meus irmãos Amâncio e Nucha, aos meus tios, Carlitos, Alberto, Abel e Timotio, pelo apoio moral, forças, compreensão, e por acreditarem sempre em mim, e aceitar as minhas decisões na vida, o que faz de mim a pessoa que me tornei hoje.

Dedico

in memoriam

Ao meu querido pai, Ismael Martins, aos meus avós, Sumal Salvador, Vilinda, que quando em vida me deram muito incentivo, me ensinaram a acreditar, nunca desistir, e acima de tudo ter humildade.

Dedico com meu maior apreço

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem feito na minha vida, pela saúde, proteção, pelas grandes vitórias alcançadas, obstáculos superados, e por estar sempre ao meu lado nesse caminho longo.

Ao meu orientador, Professor José da Cruz Machado, por tudo que fez por mim, pelo apoio moral, por aceitar a minha vinda ao Brasil, pela excelente orientação, pela amizade e aprendizado, jamais me esquecerei e agradeço do fundo do coração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nome do professor Jorge, pela carta de aceite, aos professores do Colegiado, Flávio, Edson Pozza, Ludwig, Ricardo e Vicente, pelo apoio, ensinamento e aprendizado.

Ao Departamento de Agricultura/Fitotecnia, em especial ao professor João Almir, pelo apoio no trabalho, pela bondade e disponibilidade. Ao laboratório de Análise de Sementes, em especial à técnica Dalva, ao Geraldo e à Jaqueline, por me ajudarem nas análises.

Ao MCTESTP, pelo financiamento da bolsa de estudo. À minha casa, Unizambeze – FEAF, por autorizarem a minha saída com vista à continuidade dos estudos, o meu muito obrigado.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes: Ângela, Carolina, Hudson, Luiza, Marina, Poliana, Lara, Fabiana, Layza e Guilherme, pelo companheirismo, apoio direto e indireto. Em especial à Iara pelo puxão de orelha, ajuda na montagem do experimento, pelas análises do experimento, correção do trabalho, prontidão e acompanhamento, vai a minha profunda gratidão.

Aos amigos Lucídio, Horácio e Fidel, pelo apoio e convívio. Ao Danilo, pela ajuda nas análises de dados. À técnica Ana, do Laboratório de Bacteriologia, pela ajuda na coleção, conselhos, e ajuda no material necessário para o experimento, o meu muito obrigado.

À minha mãe, Lurdes, aos meus irmãos, Amâncio e Nucha, aos meus tios, Carlitos, Timóteo e Alberto, por tudo que fizeram e fazem por mim, obrigado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, que culmina com o sonho do mestrado, vai a minha profunda gratidão.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes de soja e milho inoculadas artificialmente com o fungo *Phomopsis sojae* e *Stenocarpella maydis*, respectivamente, e a viabilidade destes fungos durante seis meses, sob duas condições de armazenamento. As sementes foram inoculadas pela técnica de condicionamento hídrico, que consiste na manutenção das sementes sobre as colônias fúngicas desenvolvidas em meio BDA, acrescido de manitol, contido em bandejas de alumínio. As sementes permaneceram por três períodos de tempo, 36, 72 e 108 horas, que corresponderam aos diferentes potenciais de inóculo denominados P36, P72, P108, e o tratamento controle P0 (sementes não inoculadas). As sementes inoculadas e não inoculadas foram submetidas a duas condições de armazenamento, câmara fria e seca (10 °C e 50% UR) e condição natural (laboratório), sendo analisadas a cada 30 dias por um período de 180 dias. A qualidade e a viabilidade dos fungos sobre as sementes foram analisadas pelos testes de sanidade, germinação e vigor (envelhecimento acelerado - EA, condutividade elétrica - CE). Em condição natural foi observada redução da incidência de *S. maydis* nas sementes de milho da ordem de 18,5%, no potencial de inóculo P72, e 80,5% no potencial P108. Com a queda da incidência do fungo ao longo do armazenamento houve um leve incremento do percentual de germinação das sementes. Pelos testes de vigor houve uma confirmação do desempenho das sementes, conforme observado pelo teste de germinação padrão. Pelo teste de envelhecimento acelerado houve aumento de 19,5% no potencial P72 e 25% no potencial P108. Pelo teste de condutividade elétrica houve aumento no valor desta variável de 46%, no potencial P108. Em ambiente de câmara fria e seca, a incidência do fungo apresentou uma tendência semelhante ao ambiente natural, porém, com menor redução quando comparado com a condição natural. Por sua vez a germinação manteve a mesma tendência de aumento nos dois ambientes de armazenamento. Da mesma forma que o ambiente natural, o vigor das sementes apresentou valores semelhantes na câmara fria e seca. Para o patossistema *Phomopsis sojae* – soja, a incidência do fungo apresentou tendência de manutenção dos valores iniciais em condição de câmara fria/seca. Para o ambiente natural houve queda na incidência do fungo aos 180 dias da ordem de 88% (P36), 28% (P72) e 69% (P108). O percentual de germinação na câmara fria/seca apresentou redução média de cerca de 67% entre os potenciais de inóculo, e em ambiente natural 64%. O vigor das sementes avaliado pelo envelhecimento acelerado apresentou resultados semelhantes à germinação padrão. Por outro lado, o vigor avaliado pela condutividade elétrica foi mantido nos mesmos níveis iniciais.

Palavras chave: Qualidade. Inoculação artificial. Viabilidade fúngica. Patologia de sementes.

ABSTRACT

The present study had as objective to evaluate the physiological quality of the seeds of soybean and maize artificially inoculated by *Phomopsis sojae* and *Stenocarpella maydis* respectively and the viability of these fungi during six months under two storage conditions. The seeds were inoculated by the water conditioning technique, which consists of maintaining the seeds on the fungal colonies developed in BDA medium, plus mannitol, contained in aluminum trays. The seeds remained for three time periods, 36, 72 and 108 hours, which corresponded to the different inoculum potentials P36, P72, P108 and the control treatment P0 (non inoculated seeds). Inoculated and non inoculated seeds were submitted to two storage conditions, cold and dry chamber (10°C and 50% RH) and natural condition (laboratory), being analyzed every 30 days for a period of 180 days. The quality and viability of the seeds were analyzed by health, germination and vigor tests (accelerated aging - EA, electrical conductivity - EC). Under natural conditions, a reduction in the incidence of *S. maydis* was observed in maize seeds of 18.5% in P72 inoculum potential and 80.5% in P108 potential. As the incidence of the fungus decreased during storage, there was a slight increase in seed germination percentage. The vigor tests confirmed the seed performance, as observed by the standard germination test. The accelerated aging test showed an increase of 19.5% in potential P72 and 25% in potential P108. By the electrical conductivity test there was an increase in the value of this variable of 46%, in the inoculum potential P108. In cold and dry chamber environment the incidence of *S. maydis* showed a similar tendency to the natural environment, but with smaller reduction when compared to the natural condition. In turn, germination presented the same upward trend in both storage environments. Like the natural environment, seed vigor showed similar values in the cold and dry chamber. For the *Phomopsis sojae* - soybean pathosystem the incidence of the fungus tended to maintain the initial values in cold / dry chamber condition. For the natural environment there was a decrease in the incidence of the fungus at 180 days of 88% (P36), 28% (P72) and 69% (P108). The germination percentage in the cold / dry chamber presented an average reduction of about 67% among inoculum potentials, and in natural environment 64%. Seed vigor evaluated by accelerated aging presented results similar to standard germination. On the other hand, the vigor evaluated by the electrical conductivity was kept at the same initial levels.

Key words: Quality. Artificial inoculation. Fungal viability. Seed pathology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Aspectos gerais da relação do fungo <i>Stenocarpella maydis</i> e sementes de milho	12
2.2	Aspectos gerais da relação do fungo <i>Phomopsis sojae</i> e sementes de soja.....	13
2.3	Inoculação de sementes por intermédio da técnica de condicionamento hídrico	14
2.4	Viabilidade de sementes de milho e soja no armazenamento.....	17
2.5	Armazenamento de sementes submetidas ao condicionamento osmótico	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Origem das sementes e obtenção dos isolados	22
3.2	Procedimento de inoculação das sementes de milho e soja	22
3.3	Condições de armazenamento das sementes inoculadas e não inoculadas	23
3.4	Variáveis avaliadas.....	23
3.4.1	Teste de sanidade (Blotter Test).....	23
3.4.2	Teste de germinação padrão.....	24
3.4.3	Teste de envelhecimento acelerado	24
3.4.4	Teste de condutividade elétrica	24
3.5	Delineamento experimental	25
3.6	Análise estatística	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Ocorrência de <i>Stenocarpella maydis</i> em sementes de milho no decorrer do período de armazenamento	27
4.1.1	Germinação das sementes de milho ao longo do armazenamento.....	31
4.1.2	Avaliação da viabilidade pelos testes de vigor	34
4.1.2.1	Condutividade elétrica das sementes ao longo do armazenamento.....	34
4.1.2.2	Envelhecimento acelerado ao longo do armazenamento	38
4.2	Análise de sementes de soja inoculadas.....	40
4.2.1	Ocorrência de <i>Phomopsis sojae</i> em sementes de soja, no decorrer do período de armazenamento	40
4.2.2	Germinação das sementes ao longo do armazenamento.....	44
4.2.3	Avaliação da viabilidade pelos testes de vigor	46
4.2.3.1	Condutividade elétrica das sementes ao longo do armazenamento.....	46
4.2.3.2	Avaliação do envelhecimento acelerado ao longo do armazenamento.....	48

5	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A.....	58
	ANEXO B.....	59
	ANEXO C.....	60

1 INTRODUÇÃO

Os fungos *Phomopsis sojae* (Lehman) e *Stenocarpella maydis* (Berkeley), são importantes agentes fitopatogênicos de ocorrência frequente no Brasil, sendo os principais causadores da seca da haste e das vagens em soja, e da podridão do colmo e das espigas em milho, respectivamente. As perdas de rendimento ocasionadas por *Stenocarpella maydis* em campos de produção de milho ultrapassam a 40% dependendo das cultivares utilizadas e condições climáticas favoráveis (COTA et al., 2013; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004). Para o fungo *Phomopsis sojae* esta perda de rendimento é mais alta, podendo chegar a 100% em períodos chuvosos associados a altas temperaturas durante o início da formação da vagem e na maturação (GOULART, 2018; HENNING et al., 2005; KIMATI et al., 1997).

Ambos os gêneros fúngicos têm uma íntima associação com as sementes de seus hospedeiros, podendo ser transmitidos eficientemente por esta via (KIMATI et al., 1997; MACHADO, 1988), e ocasionar danos na qualidade das sementes tanto em campo de produção quanto no armazenamento, quando as condições forem favoráveis à sobrevivência dos mesmos.

A disponibilidade ou acesso às sementes portadoras de agentes fitopatogênicos em níveis satisfatórios e em épocas adequadas para a realização de estudos diversos, no âmbito da patologia de sementes, encontra grandes dificuldades na prática. Uma outra dificuldade neste processo é a falta de controle ou conhecimento prévio dos níveis de ocorrência dos patógenos em lotes de sementes. Neste caso surge a necessidade de se dispor de metodologias alternativas para a obtenção de sementes portadoras dos patógenos de interesse, que possam suprir estas dificuldades de forma segura e o mais próximo possível ao que ocorre na natureza. A inoculação artificial das sementes, por diferentes métodos, tem sido utilizada baseada em estudos anteriores, havendo, no entanto, algumas limitações sob diversos aspectos (TANAKA; MENTEN, 1991).

A técnica de condicionamento hídrico desenvolvida no Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, tem sido uma alternativa das mais relevantes para obtenção de sementes contaminadas ou infectadas por patógenos, principalmente do grupo dos fungos em estudo, que possibilita obter sementes com níveis de inóculo diferenciados dos patógenos e em quaisquer épocas de sua necessidade. Esta técnica consiste na exposição direta das sementes à colônia do agente patogênico, desenvolvida em meios de

cultivos modificados com um restritor hídrico, em diferentes períodos de contato (MACHADO et al., 2003; MACHADO; MACHADO, 2002; CARVALHO, 1999).

Apesar dos avanços obtidos pela técnica de condicionamento hídrico, pouco se sabe sobre o período máximo da viabilidade dos patógenos e das sementes após a inoculação por esta tecnologia durante o período do armazenamento. Em termos práticos, é importante saber o período máximo de armazenamento em que as sementes e o patógeno a elas associado, ainda satisfazem um mínimo de qualidade fisiológica e sanitária, necessário para diversos fins, conforme já referenciado anteriormente.

Até então, a longevidade de patógenos em associação com sementes armazenadas tem sido referenciada em literatura para alguns casos, cuja interação ocorre de forma natural e não induzida artificialmente sob câmara fria e seca de armazenamento (WETZEL et al., 2004; TANAKA, 2001). Em nenhum dos patossistemas relatados em literatura leva-se em consideração o efeito de potencial de inóculo dos patógenos associados às sementes.

Dentre os vários patossistemas de importância agrícola no Brasil, cuja técnica de inoculação via condicionamento hídrico tem se mostrado eficaz para a obtenção de sementes infectadas por fungos fitopatogênicos, pouco tem sido feito para investigar o comportamento das sementes e dos patógenos durante o armazenamento. Para este estudo foram selecionados dois patossistemas, *Stenocarpella maydis* em milho e *Phomopsis sojae* em soja, considerando a grande importância dos mesmos para a agricultura brasileira na atualidade. Para estes casos, já foi demonstrada a grande eficácia da técnica de condicionamento hídrico para a obtenção de sementes infectadas pelos patógenos em foco.

Neste estudo, o propósito foi avaliar a viabilidade das sementes e dos fungos *Stenocarpella maydis* e *Phomopsis sojae* nas sementes de milho e soja, interagidos por meio do condicionamento hídrico, ao longo de um período de armazenamento em condições distintas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da relação do fungo *Stenocarpella maydis* e sementes de milho

Stenocarpella maydis (Berkeley), Sutton Sin. *Diplodia maydis* (Berkeley), constitui um dos principais fungos de ocorrência comum na cultura de milho, agente causal de podridão do colmo e da espiga, principalmente nas cultivares suscetíveis plantadas sob condições favoráveis ao seu desenvolvimento (KIMATI et al., 1997; CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006).

Este fungo pertence à classe Ascomycetes e ordem Dothideales, sendo encontrado no campo sob fase anamórfica (imperfeita ou assexuada) (KUHENM JUNIOR, 2009; CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006). No entanto, são agentes necrotróficos apresentando a fase parasitária na planta viva e saprofítica em restos de cultura (KUHENM JUNIOR, 2009). A coloração do micélio varia de branco a cinzento pálido, produz estruturas de reprodução (picnídio) de coloração marrom a preto, contendo esporos bicelulares, elípticos, retos ou ligeiramente curvados, imersos nas sementes (BRASIL, 2009) e nos internódios abaixo da superfície do solo em plantas infectadas (CASELA; FERREIRA; DE ALMEIDA, 2006; KIMATI et al., 1997).

As perdas de rendimento ocasionadas por *Stenocarpella maydis* em campos de produção de milho ultrapassam a 40% (COTA et al., 2013; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004), dependendo das cultivares e condições climáticas como, temperatura entre 22 a 30 °C, alta precipitação e umidade relativa na época da maturação dos grãos, que podem ocasionar o surgimento da doença (CASELA; FERREIRA; DE ALMEIDA, 2006).

O fungo sobrevive em sementes na forma de micélio no endosperma e embrião (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; CASELA; FERREIRA; DE ALMEIDA, 2006) e em restos de cultura deixados sobre a superfície do solo da safra anterior na forma de picnídio (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 1998), sobrevivendo por um longo período na fase saprofítica, resultando em novas infecções (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2003). As sementes infectadas constituem fonte de inóculo primário, ao crescer sobre a semente (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006).

Os danos causados por *Stenocarpella maydis* em sementes podem ser expressos e vistos na germinação, emergência e estabelecimento da plântula (REIS; CASA, 2001; CASA,

2000). O efeito drástico causado na germinação decorre de colonização do embrião pelo patógeno (CASA, 1997). No caso em que as sementes infectadas germinam e a plântula emerge infectada, o seu vigor em campo é comprometido. Após hidratação da semente com o patógeno em campo, o fungo é ativado ocorrendo o processo de transmissão e posterior colonização das plântulas, ou seja, ao entrar em contato com a água do solo, o micélio do fungo que se encontra no endosperma ou no embrião, reassume sua atividade vital e passa a crescer do interior à superfície da semente. Ao crescer sobre a semente, o fungo acaba alcançando as raízes e o coleótilo das plantas, e pela colonização do coleótilo atinge a superfície do solo, podendo ser disseminado, causando novas infecções (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006).

2.2 Aspectos gerais da relação do fungo *Phomopsis sojae* e sementes de soja

Diaporthe phaseolorum Sacc var. *sojae* (Lehman) Wehm [Sin *Phomopsis sojae* (Lehman)], constitui um dos importantes fungos da cultura de soja, agente causal de seca da haste e da vagem, e da podridão das sementes em várias regiões de cultivo (HENNING et al., 2005; KIMATI et al., 1997; MORGAN, 1992). Os sintomas em plantas aparecem na fase final do ciclo, sendo caracterizado por pontuações pretas (picnídios), que são formados linearmente na haste e pecíolo bem como nas vagens (HENNING et al., 2005). Plantas inoculadas com o fungo podem morrer no período de 7 a 10 dias, quando mantidas sob condições ótimas, indicando alta patogenicidade do fungo (TORMEN, 2014).

O fungo sobrevive em sementes na forma de micélio dormente ou picnídio em restos de cultura. A colônia é de coloração branca a marrom pálido, flocoso aéreo, de crescimento rápido, levemente denso, os picnídios se formam abundantemente em grupos de estromas negros, imersos nas sementes ou haste com conídio alfa unicelulares, hialinos, retos e fusiformes, comumente arredondados nas extremidades. Os beta-conídios são longos, filiformes, usualmente curvados (LUTREL, 1947 citado por TORMEN, 2014; BRASIL, 2009).

Phomopsis sojae é responsável por perdas de sementes, que podem chegar a 100%, especialmente quando ocorrem períodos chuvosos associados com altas temperaturas durante o início da formação e na maturação da vagem, quando ocorre o atraso da colheita (GOULART, 2018; HENNING et al., 2005; KIMATI et al., 1997).

A alta taxa de infecção das sementes em campo é refletida pela baixa germinação e emergência, originando plântulas fracas e atrofiadas, que apresentam lesões nos cotilédones. Quando a infecção é superficial (contaminação) e as sementes são distribuídas em solo úmido, chegam a emergir, porém, o fungo desenvolvido no tegumento impede a abertura dos cotilédones, dificultando a expansão das folhas primárias (TORMEN, 2014; HENNING et al., 2005; KIMATI et al., 1997).

Neste teste padrão de germinação (rolo papel), à temperatura de 25 °C, a redução dos percentuais de germinação é ainda mais drástica, o que pode ser explicado devido ao maior tempo de contato do fungo com as partes vivas da semente (GOULART, 2018; MACHADO, 1988).

As sementes infectadas ou contaminadas têm sido a principal via de dispersão do patógeno a longas distâncias, e a curta distância, os esporos são disseminados por respingos de chuva. A contaminação da vagem para as sementes em campo ocorre em dias prolongados de alta umidade relativa, associado a altas temperaturas na maturação (HENNING et al., 2005).

2.3 Inoculação de sementes por intermédio da técnica de condicionamento hídrico

A obtenção de sementes naturalmente infectadas em qualquer época e com níveis de infecção desejáveis tem sido um desafio em patologia de sementes. Uma alternativa é a inoculação artificial que possibilita a obtenção de sementes com características próximas ao que ocorre na realidade, através de várias técnicas (TANAKA; MENTEN, 1991; TANAKA; MENTEN; MARIANNO, 1989).

O uso da técnica de imersão de sementes em suspensão de inóculo previamente preparada é considerado como método tradicional e mais simples, de acordo com Tanaka e Menten (1991). Outro método que vem sendo utilizado é o de submissão de sementes em contato com a colônia do patógeno em meios de cultivo convencionais não modificados (MACHADO et al., 2011). Ambos os métodos apresentam deficiências, pois as estruturas fúngicas ficam em grande parte aderidas externamente ao tegumento das sementes, que é uma parte não viva da semente, resultando quase sempre no processo de contaminação e não infecção dos tecidos vivos, que compõem o embrião (MACHADO et al., 2001a). Outra desvantagem destes métodos consiste na morte dos conídios aderidos ao tegumento das

sementes durante o processo de secagem após este período de contato (TANAKA; MENTEN, 1991).

De acordo com Tanaka, Menten e Marianno (1989), o método de imersão de sementes de algodão em suspensão de esporos resulta em menor infestação de sementes, quando comparados com o método de contato de sementes com colônias de fungos.

Segundo Machado et al. (2001b), o prolongamento da exposição das sementes ao inóculo dos patógenos seja em suspensão ou em substrato sólido agarizado, com a finalidade de induzir o processo de infecção, não é recomendado, considerando-se que neste período adicional a semente inicia o processo de germinação interferindo no processo de infecção das sementes, desqualificando a técnica de inoculação.

Atualmente, a técnica de condicionamento hídrico, que foi desenvolvida tendo-se como base o condicionamento fisiológico das sementes também conhecida como *priming*, tem sido utilizada visando potencializar a qualidade fisiológica de algumas espécies de sementes (MACHADO; LANGERAK, 2002). De acordo com diversos estudos este método tem proporcionado resultados positivos em vários fitopatossistemas estudados, tornando-se eficiente para condução de diversos trabalhos de pesquisas em patologia de sementes (MACHADO et al., 2004; COSTA; MACHADO, 2004; CARVALHO, 1999).

A técnica de condicionamento hídrico consiste em submissão das sementes em contato direto com colônias de fungos previamente crescidos em meio de cultivo modificado com adição de um restritor hídrico, o que permite a manutenção das sementes por diferentes tempos de exposição ao substrato (MACHADO; MACHADO, 2002; CARVALHO, 1999). Esta técnica é mais eficaz quando comparadas às demais técnicas de inoculação, por permitir a obtenção de sementes com diferentes níveis de potencial de inóculo, bem como a posterior utilização das sementes após a secagem por um período de armazenamento prolongado (MACHADO et al., 2008). Mesmo no maior tempo de exposição das sementes ao inóculo, não há o processo de germinação de semente devido a lenta hidratação, o que também não prejudica o crescimento da colônia do patógeno (LIMA, 2015; MACHADO et al., 2004; CARVALHO, 1999). A inibição da germinação das sementes proporcionada por esta técnica, constitui, por outro lado, um dos procedimentos de maior importância em teste de sanidade, por impedir ou reduzir o processo de germinação das sementes ao longo de um período de incubação, permitindo a identificação dos fungos ao final deste período (MACHADO et al., 2011).

Até o momento, diversos solutos têm sido testados e utilizados como restritor hídrico como parte da técnica de inoculação via condicionamento hídrico, visando inibir e/ou retardar a germinação das sementes. Dentre estes produtos estão: cloreto de sódio (NaCl), Cloreto de potássio (KCl), manitol, polietileno glicol (PEG) e sacarose (TEIXEIRA; MACHADO; ORIDE, 2005; MACHADO et al., 2004; COUTINHO, 2000).

Os níveis de potencial hídrico adequados para a inoculação de sementes são variáveis de acordo com os patossistemas. Neste caso, o estabelecimento dos níveis deve ser baseado em pesquisas para cada espécie de sementes e dos patógenos. Fatores como temperatura, pH, nutrientes, dentre outros, afetam o comportamento dos membros deste tipo de interação, permitindo que os microrganismos cresçam em menor potencial hídrico (COOK; PAPENDICK, 1978 citado por MAGALHÃES, 2005).

Os estudos iniciais de aplicação da técnica de condicionamento hídrico na inoculação de *S. maydis* em sementes de milho foram realizados por Machado et al. (2001a, 2001b). Trabalho posterior conduzido por Carvalho et al. (2004), com este patossistema, com a finalidade de avaliar a eficácia do tratamento químico de sementes no controle do fungo associado às sementes, comprovou a eficácia desta técnica. Neste trabalho, a presença do patógeno nas sementes em um potencial de inóculo correspondente a exposição das sementes ao patógeno por um período de 96 horas, provocou uma redução de 48 % do estande avaliado pelo teste de emergência em substrato de solo sob condições controladas.

Dentre os restritores hídricos testados para a inoculação de sementes e outros usos em patologia de sementes, foi concluído por Machado et al. (2003) que manitol se apresentou como um dos mais eficientes e convenientes para uso em inoculação e teste de sanidade. Trata-se de um produto com propriedades neutras não interferindo no desenvolvimento dos fungos dentro de uma faixa de potencial hídrico que é requerido pela técnica de inoculação em foco. Em sementes de soja, níveis variáveis de -0.4 MPa a -1.0 MPa são considerados eficientes para inibir a germinação das sementes de soja comparado com o método de tratamento com o herbicida 2,4 D.

2.4 Viabilidade de sementes de milho e soja no armazenamento

O armazenamento desempenha um papel fundamental na preservação ou manutenção da qualidade das sementes, no intuito de proporcionar um ambiente no qual as mudanças fisiológicas e bioquímicas sejam mantidas em nível aceitável, evitando perdas desnecessárias, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo (SCOLARI; BONEMO, 2014; GALLI; PANIZI; VIEIRA, 2007).

Sabe-se também, que as sementes de modo geral, exercem um papel fundamental na preservação do inóculo de um grande número de fungos e outros agentes fitopatogênicos, permitindo a sobrevivência destes agentes por vários anos. Há de se ressaltar também, que a viabilidade mais prolongada de patógeno na condição dormente, em semente, deve-se certamente à maior proteção que essas oferecem, uma vez que aí encontram-se camadas protetoras e há concentração de reservas nutritivas, este período de sobrevivência na semente é variável de acordo com o patógeno, o hospedeiro e as condições de armazenamento (MACHADO, 1988).

De acordo com diversos estudos, lotes de sementes durante o processo de armazenamento estão sujeitos a transformações, deteriorações e perdas devido a interações entre os fenômenos físicos, químicos e biológicos (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005). Esta deterioração das sementes no armazenamento é um fenômeno cumulativo, reduzindo o vigor mais rapidamente do que a viabilidade (WILSON JR., 1994). A deterioração provoca danos genéticos às sementes, que poderão ou não ser expressos imediatamente ou nas gerações subsequentes (BASU, 1994).

A temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio, microrganismos, insetos e roedores, são considerados fatores chaves que exercem grande influência no ambiente de armazenamento, afetando o vigor e a germinação (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005). Segundo Bragantini e Goiás (2005), a temperatura é o fator mais importante no armazenamento, visto que, reações químicas nas sementes ocorrem com o aumento da temperatura. Com aumento da umidade na semente e redução da temperatura há inibição do desenvolvimento de microrganismos e insetos, bem como redução da atividade metabólica da semente preservando seu vigor e provavelmente o inóculo por longo período.

Além da temperatura, o teor de água influencia na viabilidade das sementes durante o armazenamento, havendo determinados níveis críticos dos quais alguns processos fisiológicos

podem sofrer interferências (COSTA, 2009). De modo geral, teores de umidade em torno de 30% favorecem a germinação da semente, teores entre 18% a 30% garantem a deterioração das sementes no armazenamento e no intervalo de 18% a 20% aumenta atividade respiratória da semente, gerando calor e potencializando o processo deteriorativo. Por sua vez, valores de umidade abaixo de 8% a 9% diminuem a atividade de insetos e microrganismos e, abaixo de 4% a 5 %, as sementes se tornam imunes ao ataque de insetos e fungos de armazenamento (BLACK; BEWLEY, 1994).

Uma boa condição de armazenamento das sementes para diversas culturas, segundo Freitas (2018), implica no uso de temperaturas abaixo de 20 °C para milho e soja. Foi demonstrado que a cada 5 °C de decréscimo da temperatura, aumenta o dobro de potencial de armazenamento, e a cada 1% de decréscimo da umidade, aumenta o dobro do potencial de armazenamento na faixa de 4 a 14%.

Os impactos da associação entre fungos e sementes podem ser muito drásticos quando as sementes são submetidas por longos períodos de armazenamento, pois, fungos de armazenamento, como por exemplo, espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, provocam injúrias em ambientes de baixa umidade relativa, interferindo na qualidade da semente (WETZEL, 1987 citado por Celano (2004).

França Neto e Henning (1992), relatam redução da qualidade fisiológica de sementes de soja em lotes de alto vigor durante o armazenamento, sendo esta redução mais acentuada em sementes que estavam associadas a *Phomopsis*. Segundo estes autores, esta redução ocorreu, provavelmente, pela alta capacidade do fungo em colonizar as partes vivas da semente.

Tekrony et al. (1984) e Henning (2004), afirmam que as sementes inoculadas naturalmente em campo, quando armazenadas em condições desfavoráveis, sofrem interferência na sobrevivência do patógeno, fazendo com que sejam altamente infetadas, fiquem com baixa qualidade fisiológica devido a associação com o fungo, restabeleça o vigor.

De acordo com Henning, Neto e Costa (1981), o efeito de tratamento químico e qualidade das sementes de soja com altos índices de *Phomopsis* sp., quando armazenadas por oito meses, sofre uma redução porcentual de incidência de *Phomopsis*, e aumento da germinação, de 54.7% para 82.1%. Neto (2013), observou uma redução da qualidade fisiológica das sementes de milho inoculadas artificialmente com *Stenocarpella maydis*, ao longo de 12 meses do armazenamento em condições ambiente.

No entanto, Wetzel et al. (2004), no teste de germinação de sementes de soja inoculadas com fungo *Phomopsis sojae*, armazenadas durante 18 meses em três condições (câmara fria e seca, laboratório e congelamento), observaram que as cultivares submetidas a condição câmara fria e seca, apresentaram menor germinação com a manutenção do fungo *Phomopsis sojae*, e na condição laboratorial a germinação aumentou até 5 meses, com a redução de 96,5% da incidência do fungo na cultivar Davis e, após este período, houve redução da germinação. Ao final do armazenamento a incidência reduziu em 100%.

Em outro estudo com a cultivar Davis, em duas condições de armazenamento (câmara fria e seca e condição do laboratório), durante 40 meses de armazenamento, foi observado que nas condições frias e secas a média de incidência inicial do patógeno de 60% manteve-se por 18 meses (61%), e só decresceu após 32 meses de armazenamento (16%), e aos 40 meses, atingiu uma incidência de 2% (WETZEL et al., 2004). Os autores concluem que, o armazenamento das sementes inoculadas naturalmente em temperaturas ambiente e sem controle de umidade, ou com maior variação da umidade relativa, são condições desfavoráveis para manutenção da viabilidade do fungo. Porém, são ótimas em condições frias e secas com vista à manutenção da viabilidade do fungo *Phomopsis*, condições consideradas ótimas na manutenção da viabilidade das sementes durante o armazenamento (WETZEL et al., 2004).

De acordo com Tanaka et al. (2000) as condições favoráveis de armazenamento de sementes, com vista à manutenção da viabilidade por longo período de tempo garantem também a sobrevivência de patógenos associados às sementes.

Para Galli, Panizi e Vieira (2007), analisando a sobrevivência de patógenos associados naturalmente às sementes de soja armazenadas em câmara fria e seca na temperatura 10 °C e 50% de umidade relativa durante 6 meses, após a inoculação da planta por pulverização a partir de suspensão de conídio de *Phomopsis* na parte aérea, revelou uma redução da incidência de 24% de *Phomopsis sojae* ao longo do período de armazenamento.

Também Wetzel et al. (2004), no estudo sobre longevidade de *Phomopsis sojae* durante o armazenamento de germoplasma de soja, em diferentes condições observaram a redução total da incidência de *Phomopsis sojae*, em condições de laboratório após 12 meses, e em câmara fria e congelamento uma redução de incidência em torno de 60% no mesmo período de armazenamento. Os autores concluíram que o armazenamento das sementes inoculadas em temperaturas ambientes, e sem controle de umidade, ou com maior variação da

umidade relativa, são condições desfavoráveis para a manutenção da viabilidade do fungo, diferentemente das condições frias e secas que proporcionaram a manutenção da viabilidade do fungo *Phomopsis* durante o período de armazenamento.

Para Tanaka et al. (2001), no estudo sobre microflora fúngica em sementes de milho, armazenado durante 12 meses sob condições frias e secas (14 °C; 40% UR) e ambiente não controlado, houve redução da sobrevivência dos fungos *Bipolaris maydis* durante o período de armazenamento, com maior destaque nas condições não controladas, no qual após 8 meses neste ambiente a incidência foi nula (0%). Informações relativamente antigas, realizadas por Meronuck (1987), consideram que o tempo de sobrevivência do fungo *Bipolaris maydis* nas sementes de milho está diretamente relacionado com as condições de ambiente do armazém, teor de água na semente, inóculo inicial, variedade bem como estado físico da semente.

Vale destacar que em nenhum dos trabalhos consultados na literatura, observou-se a avaliação dos efeitos de diferentes níveis de potencial de inóculo dos fungos em associação com as sementes. Isto se deve a incapacidade das técnicas de inoculação disponíveis nas épocas de condução dos ensaios. Por meio da técnica de condicionamento hídrico esta variável pode ser avaliada da mesma forma que outros fatores, conforme descritos em literatura.

2.5 Armazenamento de sementes submetidas ao condicionamento osmótico

O uso de substâncias químicas osmoticamente ativas, como forma de controlar a entrada de água nas sementes, tem sido amplamente difundido em tecnologia de sementes (OLIVEIRA; GOMES-FILHO, 2010). Vários trabalhos têm mostrado que os efeitos do condicionamento osmótico resultam em uma resposta mais rápida quanto ao tempo para a germinação, principalmente em lotes de sementes deterioradas ou de baixo vigor resultantes do armazenamento (FESSEL et al., 2002; LOPES et al., 1996). Esta técnica consiste no revigoramento das sementes por meio de elevação da porcentagem e velocidade da germinação, uniformizando o estante através de mecanismos de ‘reparo de membranas’ atuando no processo deteriorativo das sementes, bem como no aumento da capacidade das sementes em resistir ao estresse durante a germinação (ARIF et al., 2014; OLIVEIRA; GOMES-FILHO, 2010).

O aumento da porcentagem de germinação foi observado em sementes de milho com condicionamento em solução de polietilenoglicol 6000, e armazenadas por 30 dias nos potenciais osmótico de -0,4; -0,8; -1,2 MPa, portanto, no potencial -0.4 MPa gerou maior elevação da porcentagem da germinação em relação ao controle na ordem de 14% (PALLAORO, 2016). Também o aumento da porcentagem de germinação foi observado em sementes de soja condicionadas em PEG 6000, em relação às sementes não tratadas. Entretanto, esse aumento da viabilidade é explicado pela redução de absorção da água, prevenido possíveis injúrias durante a embebição.

Carvalho et al. (2000), ao estudarem o efeito do condicionamento osmótico em sementes de sorgo, observaram que este processo não afeta a qualidade fisiológica das sementes. Rossetto e Braz (2008) observaram que o condicionamento osmótico mantém o vigor das sementes de café armazenadas por um período de nove meses. Também foram observados no estudo sobre qualidade fisiológica de sementes de soja, submetidas em diferentes períodos de hidrocondicionamento durante o armazenamento, no qual constataram influências desta técnica na potencialização da germinação das sementes, indicando que maiores porcentagens de germinação, em torno de 78%, podem ser obtidas com 24h de hidrocondicionamento e com 82 dias de armazenamento (GIURIZATTO et al., 2008). Também Faria (2015) observou melhoria da qualidade fisiológica das sementes de girassol nas épocas quatro e oito meses de armazenamento, quando condicionadas em soluções de sacarose, tocoferol, ácido ascórbico e combinações destas substâncias nas diversas concentrações com adição do ácido giberélico (500 ppm).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Patologia de Semente do Departamento de Fitopatologia (LAPS) e Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura (DAG), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre os meses de agosto de 2018 a fevereiro de 2019.

3.1 Origem das sementes e obtenção dos isolados

As sementes de milho utilizadas para o estudo foram da cultivar BM709 PRO2 Embrapa - Sete Lagoas, da safra agrícola 2017-2018, e a de soja da cultivar TMG 7062, obtidas do Campo experimental do Departamento de Agricultura da UFLA. A qualidade sanitária e fisiológica inicial dos lotes das sementes das cultivares em estudo, foram determinadas como descrito na Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Os isolados de fungos foram obtidos da Coleção Micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, com os seguintes códigos de identificação: *Stenocarpella maydis* (n°100) e *Phomopsis sojae* (n°484).

3.2 Procedimento de inoculação das sementes de milho e soja

As sementes foram inoculadas pela técnica de condicionamento hídrico, onde utilizou substrato Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de manitol. As sementes foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1%, por 2 minutos, em seguida foram lavadas em água destilada e colocadas em bandejas contendo três papéis toalhas, previamente esterilizados, para secagem durante dois dias em temperatura ambiente.

Para inoculação foram utilizadas bandejas de alumínio 1500 mL (270 x 180 mm) previamente esterilizadas contendo papel germitest umedecido e meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (composição 40 g dextrose, 20 g de ágar em 1000 mL de água destilada), acrescidos de manitol. O potencial hídrico utilizado neste processo, foi -1,0 MPa para soja (MACHADO et al., 2001b), e para inoculação das sementes de milho utilizou-se meio aveia ágar (OA) (30 g de aveia, 15 g de ágar para 1000 ml de água destilada) acrescidos de manitol no potencial hídrico -1,4 MPa (DE FREITAS, 2006; MACHADO et al., 2001b).

Em cada bandeja foram colocados 4 discos de micélio dos isolados utilizados no estudo, em seguida as bandejas foram incubadas durante 7 dias em câmara do tipo BOD na temperatura de $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. Após este período 150 gramas de sementes foram distribuídas em camada única e mantidas em incubadora a 25°C e fotoperíodo de 12 horas pelos períodos de 36 h, 72 h, 108 h, correspondentes a quatro potenciais, sendo que, 0 horas (testemunha; Potencial 0 = P0), 36 horas (Potencial 1 = P1), 72h (Potencial 2 = P2) e 108h (Potencial 3 =P3). Decorridos este período, as sementes foram retiradas das bandejas e secas durante 2 dias em temperatura ambiente. Após a secagem as sementes foram subdivididas em porções de acordo com os tratamentos, e em seguida, acondicionadas em sacos de papel multifoliadas de (tamanho: 55x35cm), de forma separada com base na cultura e no potencial de inóculo.

3.3 Condições de armazenamento das sementes inoculadas e não inoculadas

Após a inoculação das sementes foram separadas amostras de 2 kg por potencial de inóculo em duas sob amostras de 1 kg cada e, posteriormente, armazenadas em dois ambientes: a) ambiente controlado (câmara fria e seca), na temperatura 10°C e 50% de umidade e; b) condição natural (ambiente de laboratório). As avaliações da viabilidade dos fungos qualidade fisiológica e sanitária foram realizadas a cada 30 dias, durante 6 meses (180 dias) de armazenamento.

3.4 Variáveis avaliadas

3.4.1 Teste de sanidade (Blotter Test)

Por tratamento, foram utilizadas 200 sementes, divididas em 4 repetições de 50, as quais foram dispostas individualmente sobre camada de papel de filtro (3 discos sobrepostos) em uma solução de 2,4-D (diclorofenoxiacetato de sódio), concentração de 5 ppm para sementes de soja, e para as sementes de milho utilizou-se a técnica de congelamento. As sementes foram colocadas em placas de Petri de vidro de 15 cm de diâmetro mantendo-se distanciadas 1-2 cm uma das outras e foram mantidas em ambiente com temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias para as sementes de soja e 5 dias para as sementes de

milho. Em seguida, as sementes foram examinadas individualmente em microscópio estereoscópico (resolução de 30-80X) e microscópio ótico. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas/ contaminadas (BRASIL, 2009).

3.4.2 Teste de germinação padrão

Este teste foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, perfazendo um total de 200 sementes por tratamento. Foi utilizada a metodologia de Rolo de Papel em que o substrato é umedecido com água na proporção 2,5 vezes o peso do papel. A temperatura utilizada foi de 25 °C e a avaliação feita aos sete dias, seguindo os critérios estabelecidos nas 'Regras para Análise de Sementes' do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2009).

3.4.3 Teste de envelhecimento acelerado

As sementes utilizadas foram colocadas em camada única, 50 sementes por repetição, no total de 200 sementes por tratamento, sobre telas de alumínio, dentro de caixas de acrílico (gerbox), de tamanho 11 x 11 cm, e no fundo de cada caixa foram colocados 40 mL de água destilada, sem contato direto com as sementes. As caixas foram fechadas e mantidas em incubadoras do tipo BOD a 42 °C e 100% de UR por 48 horas. Após esse período, foi realizado teste de germinação padrão com quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Após cinco dias da germinação em rolo papel foram feitas as avaliações. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais, anormais e mortas para cada tratamento (BRASIL, 2009).

3.4.4 Teste de condutividade elétrica

Quatro amostras de 50 sementes por tratamento foram previamente pesadas em balança de precisão de 0,001g, em seguida colocadas para embeber em copos plásticos contendo 70 mL de água deionizada, e mantidas em câmara incubadora tipo BOD por 24 horas à temperatura de 25 °C, no escuro. Após período de embebição foram realizadas as leituras de condutividade elétrica por meio de condutivímetro MS TECNOPON®, modelo mCA 150 previamente calibrado com solução de KCl. Posteriormente à leitura, os resultados

foram subtraídos da leitura inicial do controle e divididos pelo peso da amostra, obtendo-se o resultado final em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ com base na metodologia descrita por Vieira e França Neto (1999).

3.5 Delineamento experimental

O experimento consistiu no delineamento inteiramente casualizado (DIC), onde os tratamentos seguiram um esquema fatorial (2 x 4 x 7), sendo duas condições de armazenamento (câmara fria e seca e condição natural do laboratório); quatro potenciais de inóculo (P0 = 0 horas; P1=36 horas; P2= 72 horas e P3=108 horas) e; seis períodos de armazenamento (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 108 dias). Os tratamentos consistiram da interação entre os três fatores, sendo 56 tratamentos com 4 repetições correspondentes a 224 unidades experimentais.

3.6 Análise estatística

Análises estatísticas dos dados foram feitas no pacote estatístico R STUDIO versão 1.1.423, a análise da variância (ANAVA) dos dados de germinação (GE), incidência (I), condutividade elétrica (CE), envelhecimento acelerado (EA), foram realizados com base no teste F a 1 % de probabilidade. A significância observada nas interações entre os fatores testados nas diversas variáveis em estudo, e após análise de variância pelo teste F, foi realizado o ajuste de superfície resposta destas variáveis em relação aos potenciais de inóculo e período de armazenamento das sementes sob duas condições. A escolha do modelo de melhor ajuste com vista a estimar a superfície resposta foi com base na significância dos coeficientes de regressão, no coeficiente de determinação (R^2), na análise do resíduo. O modelo utilizado foi: $f = y_0 + a \cdot P + b \cdot T + c \cdot P^2 + d \cdot T^2$, sendo que f = variável dependente, P = período de armazenamento de sementes (Dias), T = potenciais de inóculo (Horas). O software SigmaPlot versão 10.0 foi utilizado para a representação gráfica dos dados (MAXIMIANO, 2017). A normalidade dos resíduos foi realizada de acordo com o método gráfico QQ plot, para o teste de homogeneidade utilizou-se o teste de Levene a 5% de probabilidade. Foram feitas análises de variância e comparações de médias pelo teste de Tukey para o fator qualitativo (condições de armazenamento) e para fatores quantitativos fez-

se análise de regressão polinomial, considerando como variáveis dependentes: germinação, condutividade elétrica e envelhecimento acelerado e incidência e, como variável independente: potencias de inóculo e período de armazenamento das sementes. Posteriormente foram determinados os valores de coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de resíduos e os dados da distribuição normal. Fez-se análise separada da variável incidência de milho, considerado tratamento adicional (P0), no qual o teste de comparação de média foi feito de acordo com a diferença mínima significativa (dms).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do perfil das sementes utilizadas neste estudo demonstrou que os fungos *Stenocarpella maydis* e *Phomopsis sojae* estavam ausentes nas mesmas. O teste de germinação padrão aplicado revelou que as sementes de milho apresentaram níveis de germinação de 100 % e as sementes de soja 96%.

4.1 Ocorrência de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho no decorrer do período de armazenamento

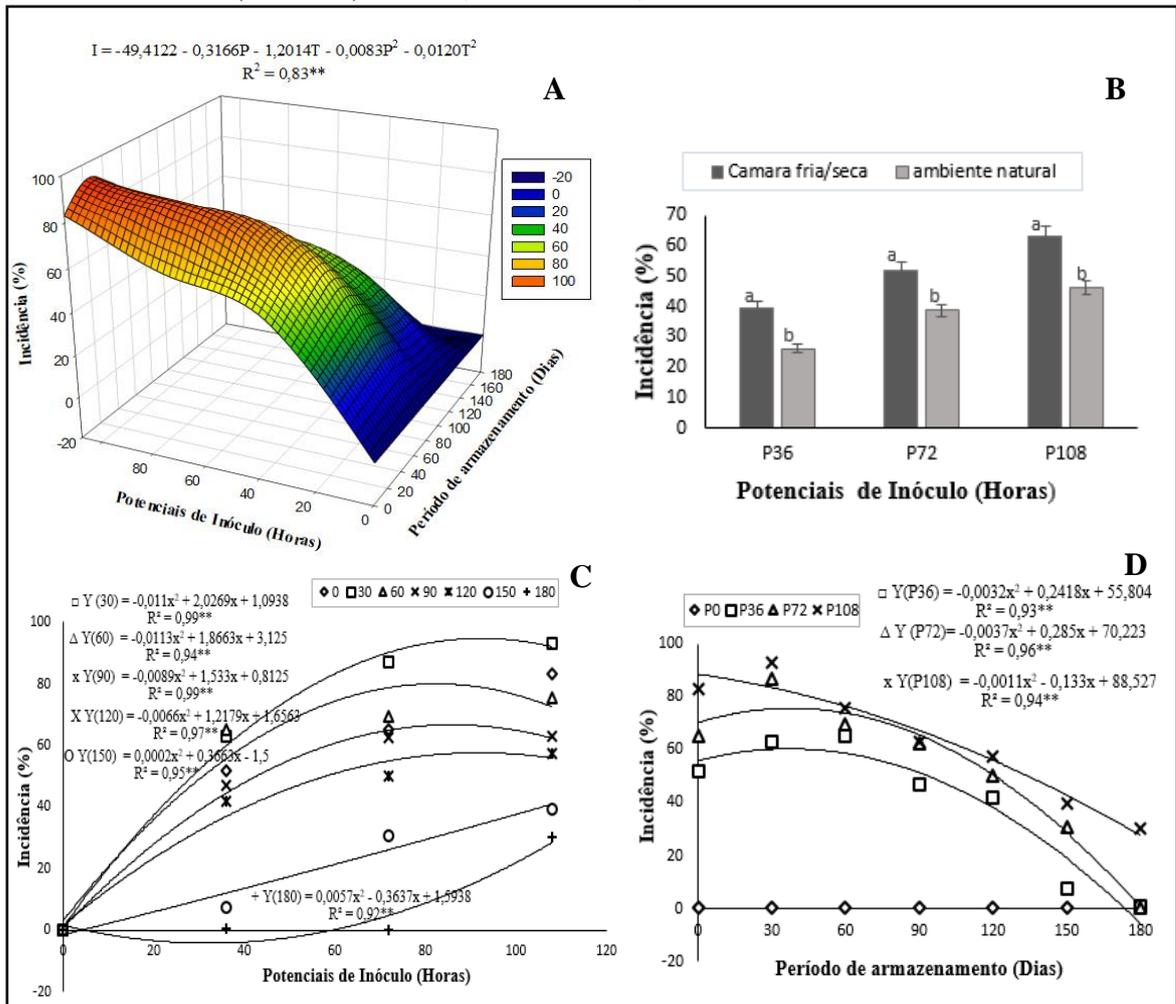
De acordo com a análise da variância conjunta, houve diferenças significativas entre os três fatores em estudo, bem como a sua interação em relação às variáveis incidência e condutividade elétrica, não havendo interação entre os fatores para as variáveis germinação e envelhecimento acelerado (ANEXO A). O modelo ajustado foi significativo pelo teste F ($P \leq 1\%$) para todas as variáveis analisadas, a correlação de Pearson entre o resíduo e a curva da distribuição normal foi positiva, e de acordo com o gráfico da qq plot, houve normalidade.

Houve interação significativa ($P \leq 1\%$) entre condições de armazenamento x período de armazenamento x potencial de inóculo em ambas condições de armazenamento, isto é, a redução da incidência de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho foi influenciada pelos potenciais de inóculo e dias de armazenamento (FIGURA 1A e FIGURA 2A). A infecção das sementes foi proporcional ao tempo de exposição das sementes ao inóculo. Este fato evidencia a eficiência da técnica de inoculação utilizada em obter sementes infectadas, demonstrando que a infecção das sementes ocorreu a partir de 36 horas de exposição.

De acordo com os resultados, independentemente das condições de armazenamento das sementes inoculadas, os maiores valores de potenciais de inoculação proporcionaram maiores valores médios de incidência do fungo *Stenocarpella maydis*, ao longo de todo o período de armazenamento (FIGURA 1D). Observa-se, também que a incidência do fungo reduziu com o armazenamento das sementes em ambas condições, sendo que, na condição natural, a redução foi mais acentuada em relação à câmara fria e seca (FIGURA 1C e FIGURA 2C). Siqueira, Barrocos e Machado (2016), no estudo sobre transmissão de *Stenocarpella maydis* a partir de sementes de milho, observaram que o aumento do tempo de exposição das sementes ao inóculo provocou aumento de número sementes infectadas, resultando em maior incidência do mesmo.

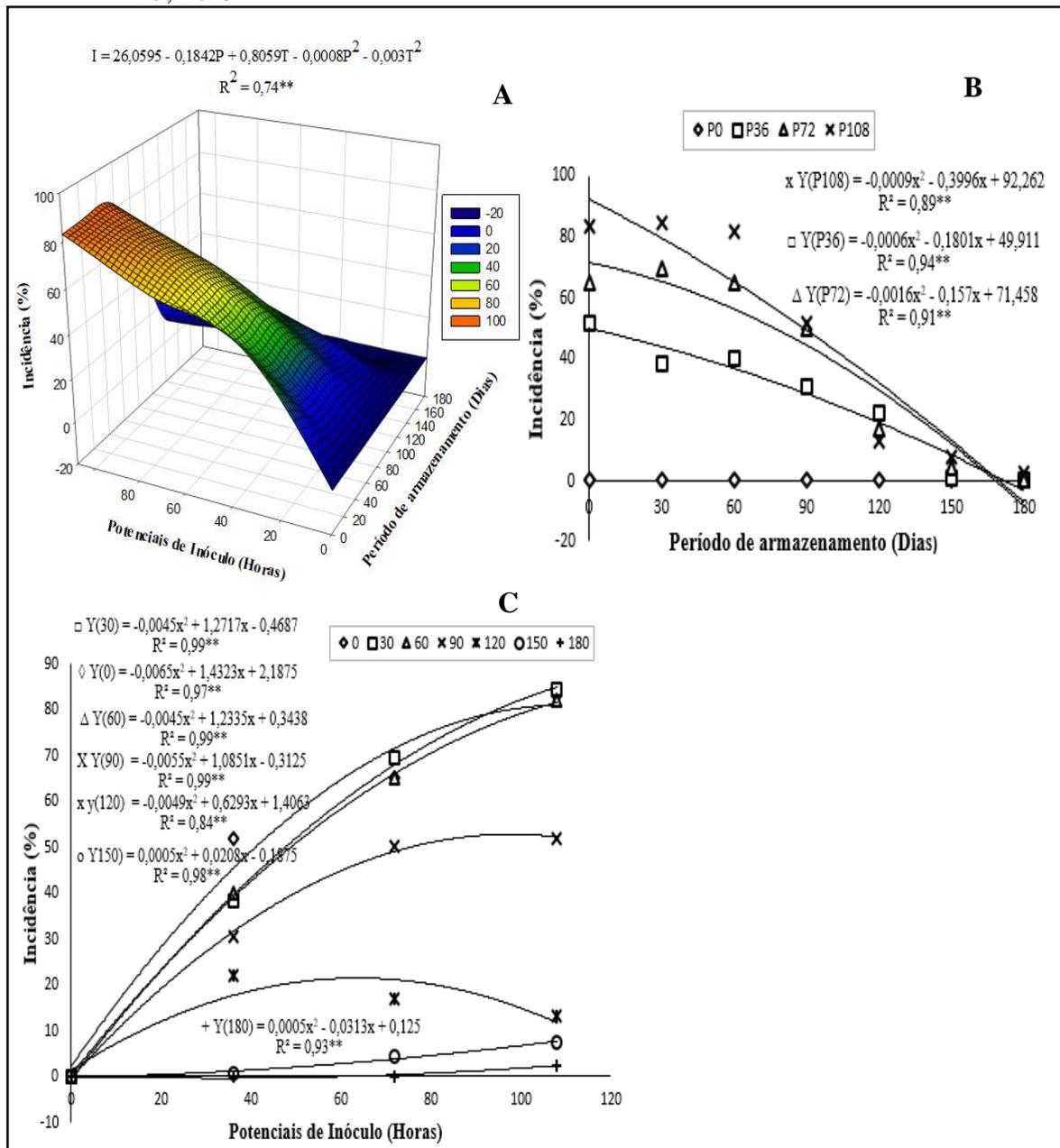
Resultados similares foram observados por Celano (2004), no estudo sobre desempenho de sementes de algodão durante o armazenamento após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica de restrição hídrica, independentemente das condições em que as sementes foram armazenadas, o aumento da incidência foi proporcional ao aumento do potencial de inóculo das sementes em estudo.

Figura 1 - Incidência (%) de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (HORAS), diferentes períodos de armazenamento (DIAS) e armazenadas sob câmara fria e seca e ambiente natural: (A) Superfície de resposta referentes a incidência (%) em função dos potenciais de inóculo (HORAS) e período de armazenamento (DIAS); (B) Valores médios de incidência nos potenciais de inóculo em função das condições de armazenamento; (C) Relação entre potenciais de inóculo e incidência nos meses de armazenamento; (D) Relação entre período de armazenamento e incidência nos diferentes potenciais de inóculo (HORAS). UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 2 - Incidência (%) de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (HORAS), diferentes períodos de armazenamento (DIAS) e armazenadas sob condição natural: (A) Superfície de resposta referentes a incidência (%) em função dos potenciais de inóculo (HORAS) e período de armazenamento (DIAS); (B) Relação entre período de armazenamento e incidência nos diferentes potenciais de inóculo (HORAS); (C) Relação entre potenciais de inóculo e incidência nos meses de armazenamento. UFLA, Lavras-MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

O efeito do restritor hídrico manitol na qualidade fisiológica das sementes no tratamento controle ao longo deste estudo, não foi significativo, ou seja, não houve influência deste restritor sobre a qualidade das sementes ao longo do armazenamento.

Pelo teste de médias observou-se que os ambientes dentro dos potenciais de inóculo durante o período de armazenamento influenciaram a incidência do fungo *Stenocarpella maydis*. Observa-se também, que na condição de câmara fria e seca, a incidência ao longo do armazenamento em todos potenciais de inóculo foi maior em comparação com o armazenamento em condições de ambiente natural (FIGURA 1B).

Os maiores valores médios de incidência de *Stenocarpella maydis* em câmara fria e seca, ao longo do armazenamento, deve-se certamente ao fato destas condições serem mais favoráveis a sobrevivência e manutenção do fungo associado às sementes.

Observa-se também que, em câmara fria e seca, ocorreu uma manutenção da incidência do patógeno até os 60 dias de armazenamento, após esse período houve um decréscimo gradual sendo que, até aos 90 dias de armazenamento a porcentagem de incidência estava em níveis acima de 50% nos maiores potenciais de inóculo P72 e P108. Decorridos 108 dias de armazenamento a ocorrência do fungo foi de 30% (FIGURA 1D). Para o ambiente de armazenamento em condição natural, observa-se um decréscimo linear acentuado da incidência do fungo a partir de 30 dias após início do armazenamento, sendo que aos 180 dias de armazenamento, no maior potencial de inóculo (P108), a incidência foi de 2.5%, o nível de incidência do patógeno foi mantida acima de 50% até 60 dias de armazenamento (FIGURA 2B).

Em outros estudos envolvendo diferentes patossistemas, constata-se que, embora não se tenha levado em conta os níveis de potenciais de inóculo, houve a mesma tendência de comportamento das interações como no presente caso. Tanaka (2001), em estudo sobre microflora fúngica em sementes de milho armazenadas, concluíram que as condições de ambiente frio e seco (14 °C; 40% UR) foram mais favoráveis para a manutenção dos níveis de incidência dos fungos *Alternaria alternata*, *Bipolaris maydis*, *Cephalosporium acremonium*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*, em comparação com o ambiente de natural de armazenamento. Os autores enfatizam que, o ambiente não controlado, além de reduzir o inóculo nas sementes, acelera o processo de deterioração das sementes, enquanto que a câmara fria e seca favorece a manutenção da viabilidade dos fungos, comprometendo por sua vez, a qualidade sanitária das sementes para uso posterior.

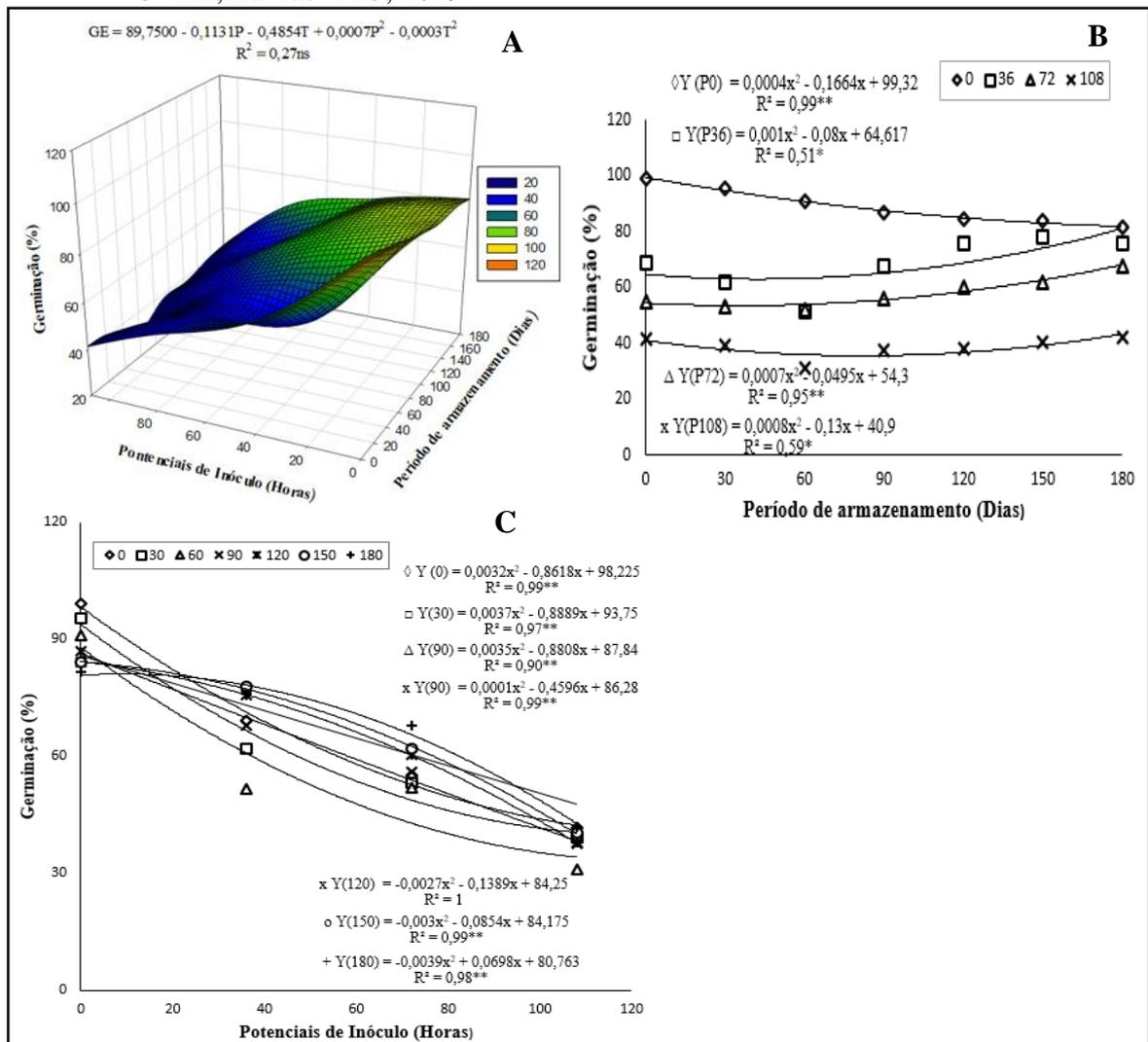
Segundo Wicklow, Weaver e Throne (1998) e Berjak (1987), o tempo de sobrevivência da *Stenocarpella maydis* em sementes de milho está diretamente relacionado com as condições de ambiente do armazém, teor de água, inóculo inicial, tipo de espécie ou variedade do hospedeiro, estado físico das sementes dentre outros fatores.

Tanaka (2001) observaram a redução acentuada de sobrevivência de *Stenocarpella maydis* presente nas sementes em associação espontânea em condições de ambiente não controlado, em comparação com a câmara fria e seca durante 12 meses de armazenamento. Vale ressaltar, que nestes estudos não foram levados em consideração o efeito ou influência do fator nível de potencial de inóculo dos patógenos inicialmente presentes nas sementes. Celano (2004), também observou que as sementes inoculadas com fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, e armazenadas durante 8 meses sob duas condições de armazenamento, câmara fria e seca e condição natural, mantiveram a viabilidade do patógeno no nível de 58% sob câmara fria e seca e 4% sob condição não controlada.

4.1.1 Germinação das sementes de milho ao longo do armazenamento

Não houve diferenças significativas ($P \leq 1\%$) na porcentagem de germinação entre as condições de armazenamento das sementes e período de armazenamento, bem como não houve influência do período de armazenamento e potenciais de inóculo sobre a germinação de sementes de milho (FIGURA 3A). Porém, houve influência do período de armazenamento nos potenciais de inóculo sobre a germinação das sementes. O maior potencial de inóculo (P108) em ambas as condições de armazenamento provocou uma redução drástica da germinação das sementes ao longo do armazenamento (FIGURA 3B), o que reafirma resultados de trabalhos anteriores sobre a eficácia comprovada da técnica de condicionamento hídrico, em possibilitar a obtenção de sementes com diferentes níveis de infecção. Em um dos estudos anteriores, conduzidos por Guimarães (2016), o maior potencial (P96), do fungo *Stenocarpella maydis* em sementes de milho, resultava na maior perda de germinação até 11 em comparação aos outros potenciais (P0= 94 %, P24 = 74,5% e P48= 62%).

Figura 3 - Germinação (%) em sementes de milho inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas de inóculo), diferentes condições de armazenamento (câmara fria e seca e condição natural) e diferentes períodos de armazenamento (dias): (A) Superfície de resposta referentes a germinação (%) em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (B) Relação entre período de armazenamento e germinação nos diferentes potenciais de inóculo (Horas); (C) Relação entre potenciais de inóculo e germinação nos meses de armazenamento. UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

Baseando nos valores médios da percentagem de germinação nos potenciais de inóculo, o armazenamento sob câmara fria e seca obteve altos valores de germinação quando comparados com o armazenamento sob condição natural, sendo que, em câmara fria e seca, teve um incremento na ordem de 6% (P0), 7% (P36), 8% (P72) e 3% (P108).

Embora a câmara fria e seca favoreça a sobrevivência de fungos, como *Stenocarpella maydis* em sementes de milho, a porcentagem de germinação das sementes, neste ambiente, não sofreu influência significativa quando comparada ao armazenamento em ambiente não controlado. Isto se deve, provavelmente, a baixa taxa de deterioração das sementes neste ambiente, que resulta da conservação da integridade da membrana celular, dificultando a penetração do fungo e destruição dos tecidos internos da semente.

De modo geral, sabe-se que temperatura e umidade atmosférica no ambiente de armazenamento exercem grande influência na qualidade final das sementes. Para muitos pesquisadores como Bragantini e Goiás (2005) e Plazas, Medina e Novo (2003), a temperatura do armazenamento influencia na taxa de deterioração das sementes, sendo ressaltado que altas temperaturas elevam as atividades metabólicas, interferindo na quebra da integridade da membrana celular das sementes e consequente perda do vigor.

Carvalho et al. (2010), no estudo sobre qualidade fisiológica de sementes de milho, sob duas condições de armazenamento, observaram que, quando o milho não inoculado foi armazenado por 180 dias em condições frias (20 °C) houve manutenção da porcentagem de germinação em torno de 94.66% em relação a condição natural que foi de 3.86%.

Observa-se, também uma redução da porcentagem de germinação até aos 60 dias de armazenamento em função dos potenciais de inóculo. Após 60 dias de armazenamento, com a redução da incidência do patógeno, as sementes mantiveram a porcentagem de germinação em ambas as condições, embora em níveis baixos quando comparados ao tratamento controle (não inoculado) (FIGURA 3B). Decorridos 180 dias de armazenamento, a germinação foi restabelecida em todos os potenciais de inóculo, sendo que, os menores potenciais obtiveram boa germinação (FIGURA 3C).

Resultados semelhantes foram observados por Celano (2004), onde o autor constatou o aumento da germinação em sementes de algodão de 29%, com a queda da viabilidade do inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioido* nas sementes ao longo dos 8 meses (230 dias) de armazenamento sob condições frias e secas.

Segundo Henning (2004), esta perda rápida de viabilidade do fungo durante o armazenamento, principalmente em condições de ambiente natural, e o aumento gradual da porcentagem de germinação em laboratório, depende, também, da qualidade fisiológica inicial das sementes.

4.1.2 Avaliação da viabilidade pelos testes de vigor

4.1.2.1 Condutividade elétrica das sementes ao longo do armazenamento

Houve interação entre os três fatores sobre a condutividade elétrica em sementes de milho ($P \leq 1\%$) (ANEXO A). Isto é, os ambientes de armazenamento, potenciais de inóculo e período de armazenamento de sementes influenciaram, de forma simultânea, a quebra de integridade da membrana e a liberação de íons (FIGURA 4A e FIGURA 5A). Na câmara fria e seca, observa-se aumento acentuado de condutividade elétrica no maior potencial de inóculo (P108), manutenção de liberação de íons ao longo do período de armazenamento nos tempos de exposição das sementes com o fungo (FIGURA 4C), e o aumento de liberação de íons nas sementes não inoculadas (controle) (FIGURA 4D). Em câmara fria e seca, a maior perda de deterioração da semente foi observada após 120 dias de armazenamento com liberação de $29,5\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de íons no P108 (FIGURA 4C).

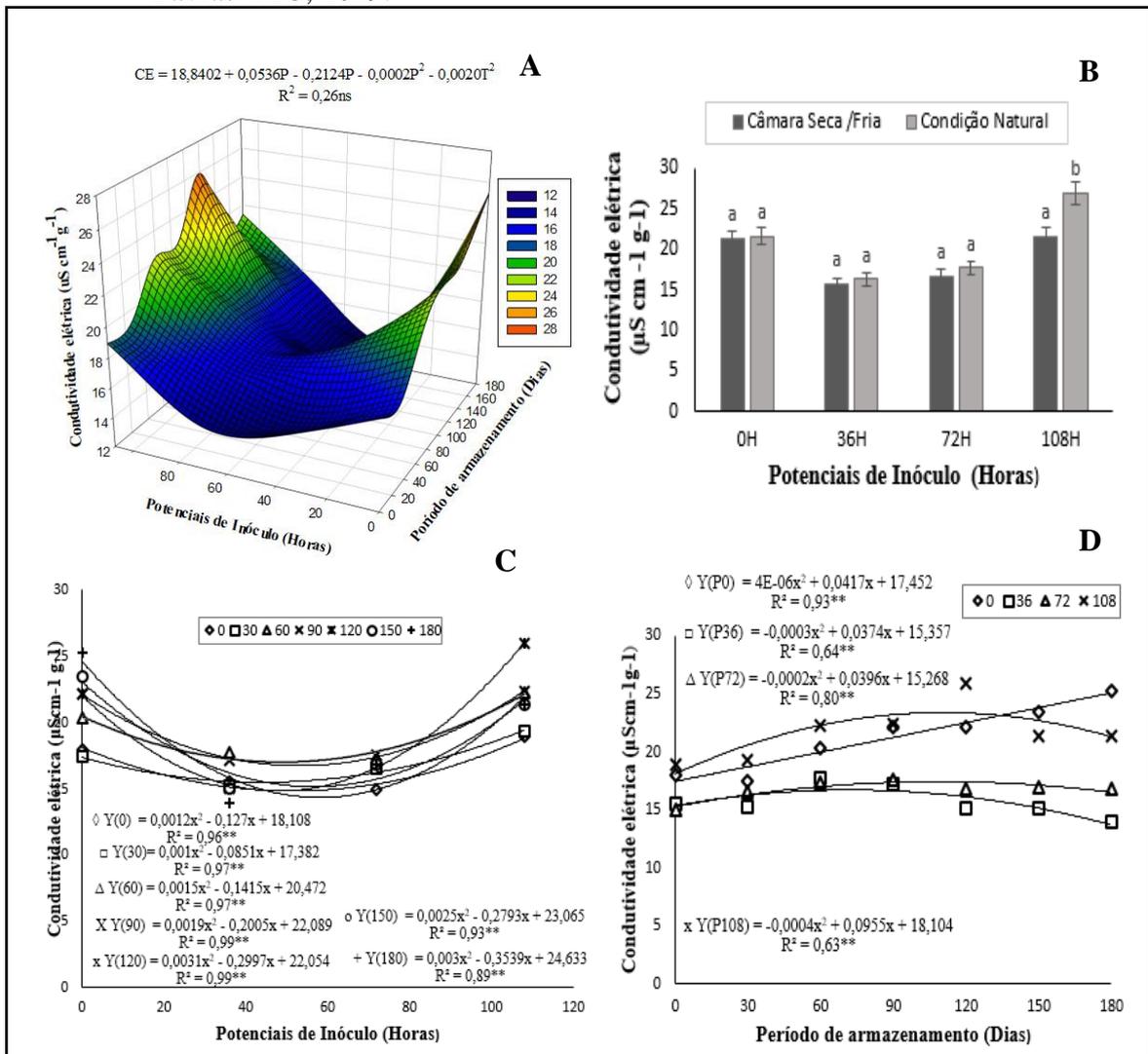
O alto valor da condutividade elétrica observado no maior potencial de inóculo das sementes, pode ser explicado pela alta incidência do fungo, que possivelmente tenha rompido a integridade estrutural da membrana protetora. Resultados estes, que corroboram com os verificados por Guimarães (2016), onde, nesse patossistema, o controle obteve maior condutividade em relação aos potenciais intermediários (P24 e P48) e maior valor, dessa variável, no maior potencial de inóculo (P96).

O armazenamento sob condição natural resultou na alta taxa de deterioração das sementes, culminando na perda da integridade da membrana celular no maior potencial de inóculo, quando comparados com armazenamento sob câmara fria e seca (FIGURA 4B). O tratamento controle apresentou maior liberação de íons, em torno de $21 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$, em relação aos potenciais inóculo intermediários (P36 e P72) em ambas condições de armazenamento, o que revela o efeito *priming* do manitol no rearranjo da integridade da membrana celular, onde, de acordo com Vieira e Krzyzanowski (1999), quanto menor o resultado da condutividade elétrica, mais organizadas encontram-se as membranas celulares, não permitindo a passagem de solutos do meio interno das sementes para o meio externo.

O efeito manitol no rearranjo da membrana das sementes, restringindo a absorção de água foi observado por Carvalho (1999) em sementes de feijão. Por este estudo, a absorção de água nas sementes, nos potenciais mais negativos, era reduzida e, assim, havendo inibição da

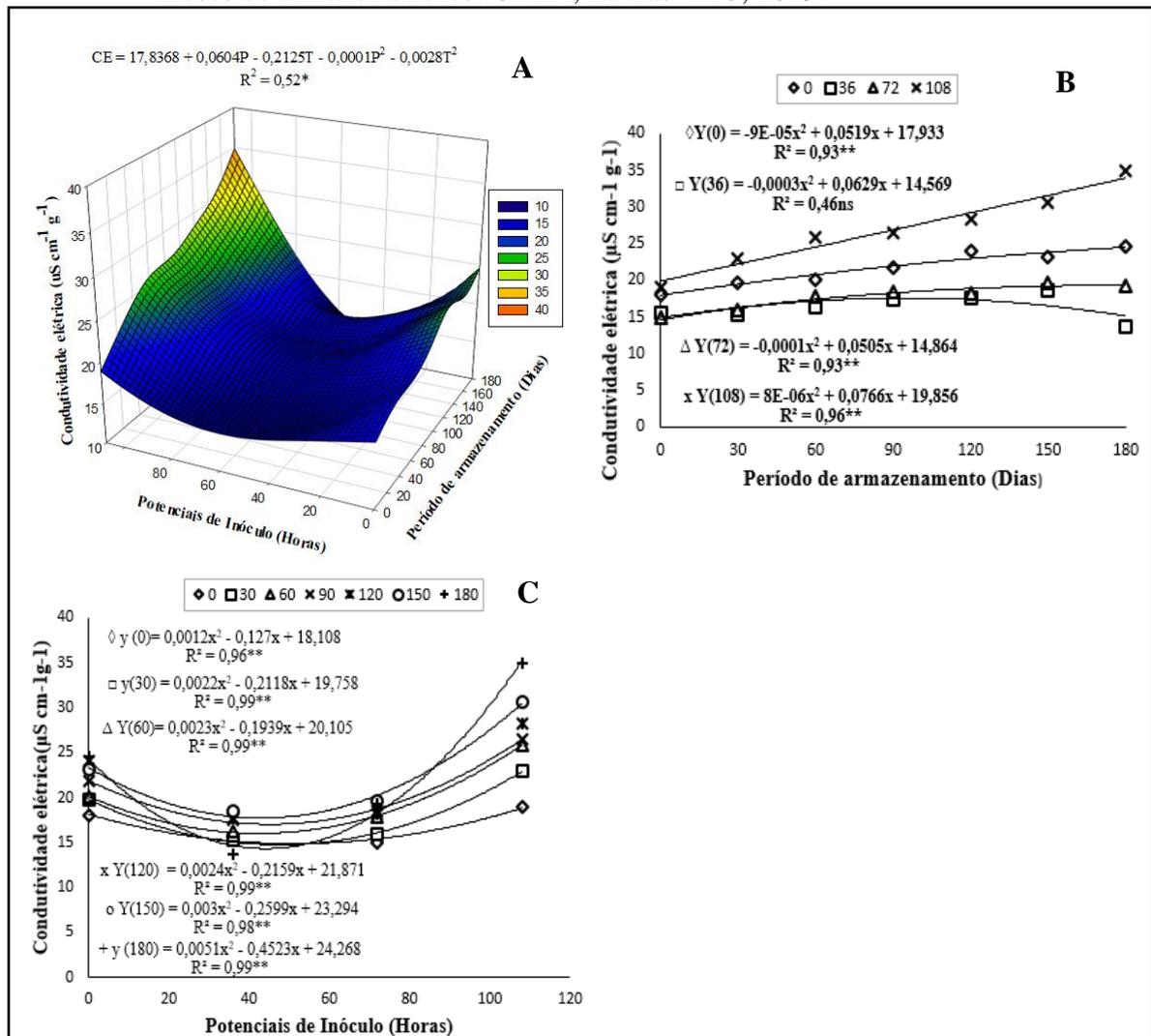
emissão da radícula. Neste trabalho, os menores potenciais de inóculo de *S. maydis* não exerceram influência sobre a deterioração das sementes de milho, tanto em câmara fria e seca, bem como na condição natural (FIGURA 4B).

Figura 4 - Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$) em sementes de milho inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas), diferentes períodos de armazenamento (Dias) e armazenadas sob câmara fria e seca: (A) Superfície de resposta referentes a condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$) em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (B) Valores médios de condutividade elétrica nos potenciais de inóculo em função das condições de armazenamento; (C) Relação entre potenciais de inóculo e condutividade elétrica nos meses de armazenamento; (D) Relação entre período de armazenamento e condutividade elétrica nos diferentes potenciais de inóculo (Horas). UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 5 - Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$) em sementes de milho inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas), diferentes períodos de armazenamento (Dias) e armazenadas sob condição natural: (A) Superfície de resposta referentes a condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$) em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (B) Relação entre período de armazenamento e condutividade elétrica nos diferentes potenciais de inóculo (Horas); (C) Relação entre potenciais de inóculo e condutividade elétrica nos meses de armazenamento. UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

Para o armazenamento em condição natural, houve influência em todos os potenciais de inóculo sobre a degradação da integridade da membrana das sementes e, conseqüentemente, determinando maior liberação de íons ao longo do armazenamento, quando comparado com o armazenamento em câmara fria e seca (FIGURA 5B). A maior perda de deterioração da semente foi observada decorridos 180 dias de armazenamento com a liberação de $34,8 \mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ de íons no P108 (FIGURA 5C).

Houve uma tendência linear crescente dos valores de condutividade elétrica em todos os potenciais de inóculo ao longo dos períodos de armazenamento, no qual, o coeficiente de determinação foi alto em quase todos os potenciais (FIGURA 5B). Isto indica maior influência dos meses de armazenamento no aumento da condutividade elétrica.

Percebe-se neste estudo, que a temperatura no armazenamento de sementes atuou de maneira significativa na perda de vigor das sementes, fato também constatado em outro trabalho, como o de Faroni, Barbosa e Cardoso (2005), pelo qual o aumento da temperatura do armazenamento de sementes na faixa de 20 a 40 °C, provocou um aumento proporcional ao valor da condutividade elétrica.

A perda de integridade da membrana e, conseqüentemente, aumento na liberação de íons em sementes de milho na condição não controlada ao longo do armazenamento, pode ser explicada pela incidência do fungo, bem como por estresse devido a variação da temperatura, resultando no aumento da taxa da atividade metabólica das sementes, culminado com a perda de vigor. Esta informação é sustentada pelos autores Plazas et al. (2003) e Bragantini (2005), que afirmam que a temperatura exerce maior efeito na deterioração de sementes armazenadas, por isso, devem ser mantidas em níveis baixos.

A incidência do fungo nas sementes e sua viabilidade no armazenamento contribuíram de forma significativa na degradação da membrana, resultando na maior lixiviação de eletrólitos ao longo do período. Este resultado é confirmando por Frigeri (2007) no estudo sobre interferência dos patógenos em teste de vigor em sementes de feijão, o autor observou que a infecção de sementes de feijão por *Macrophomina phaseolina* pelo período de 16 horas e de *C. dematium* f. sp. *truncata* e *C. lindemuthianum* por 48 horas com o uso de manitol (-1,0 MPa), é suficiente provocar interferência desses organismos na condutividade elétrica.

Frigeri (2007), no mesmo estudo, verificou que em lotes de sementes de feijão com 0, 25, 50, 75 e 100% de incidência de *C. Lindemuthianum*, a liberação de íons foi notória a partir de 25% para cultivar FT Nobre e 75% para as sementes da cultivar Carioca. Fessel et al. (2010), no estudo sobre efeito da temperatura e do período do armazenamento no teste de vigor (condutividade elétrica), em sementes de soja, observaram que, com o aumento da temperatura até 30 °C, durante 15 meses, aumentava-se também os níveis íons liberados.

Independentemente das condições do armazenamento das sementes, não houve diferença de condutividade elétrica até 60 dias de armazenamento, este resultado deve-se provavelmente a não variação da incidência e do teor de umidade nas sementes nos potenciais

de inóculo. Faroni, Barbosa e Cardoso (2005) também não observaram variação da deterioração de grãos de milho pela medição de condutividade elétrica no mesmo período de armazenamento.

4.1.2.2 Envelhecimento acelerado ao longo do armazenamento

Não houve influência dos três fatores sobre a germinação após o envelhecimento acelerado de sementes de milho inoculada (ANEXO A). Porém, houve diferenças significativas ($P \leq 5\%$) dos ambientes de armazenamento dentro dos potenciais de inóculo, bem como influência dos períodos de armazenamento e potencial de inóculo sobre a germinação após o envelhecimento acelerado em ambas as condições. O aumento dos potenciais de inóculo reduziu a porcentagem de germinação, entretanto, ao longo do armazenamento, esta porcentagem de germinação foi se restabelecendo em ambas as condições (FIGURA 6A e FIGURA 6B).

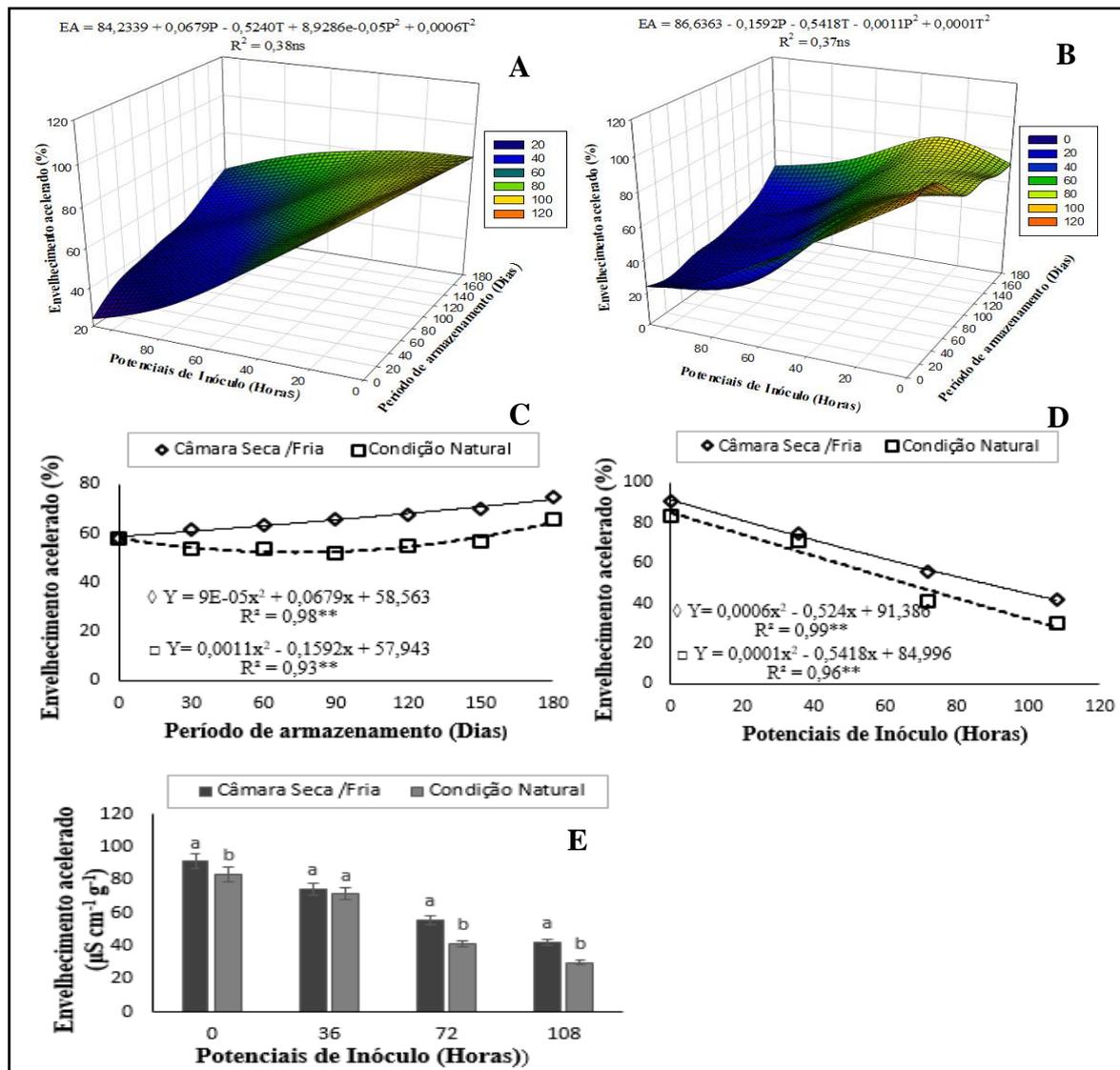
No armazenamento sob condição seca e fria, houve maior taxa de germinação ao longo do armazenamento, mesmo com a deterioração promovida pelo acondicionamento das sementes em ambiente com altas temperaturas (42 °C) (FIGURA 6C). Em condição natural de armazenamento houve maior perda de germinação quando comparados com o armazenamento sob câmara fria e seca. E, independentemente da condição de armazenamento, os maiores potenciais de inóculo tiveram maior perda de germinação de sementes, comprovando novamente o efeito drástico do maior tempo de contato das sementes com a colônia fúngica (FIGURA 6D e FIGURA 6 E).

A maior taxa de germinação em condições secas e frias, mesmo após o estresse forçado das sementes, comprova o efeito do controle de temperatura na preservação do inóculo nas sementes e na qualidade das sementes, minimizando os danos, garantindo o vigor, embora em níveis baixos quando comparado com as sementes não inoculadas (controle).

Para Delouch e Baskin (1973) citados por Celano (2004), qualquer estresse sofrido pelas sementes decorrente do ambiente de armazenamento, temperatura, umidade, presença de microrganismos, influencia na taxa de deterioração. Mc Donald, Gupta e Schmitthenner (1993) e Marcos Filho (1994), comentam que o aumento da temperatura e umidade proporcionados pelo teste de vigor em uso neste trabalho, pode inibir alguns microrganismos de campo, fazendo com que o teste de germinação após envelhecimento acelerado seja

superior em relação à germinação normal antes do envelhecimento acelerado com as mesmas amostras de sementes.

Figura 6 - Envelhecimento acelerado (%) em sementes de milho inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas), diferentes condições de armazenamento (câmara fria e seca e condição natural) e diferentes períodos de armazenamento (dias): (A) Superfície de resposta referentes à envelhecimento acelerado em sementes de milho armazenadas sob câmara fria e seca em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (B) Superfície de resposta referente à envelhecimento acelerado em sementes de milho armazenadas sob condição natural em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (C) Relação entre período de armazenamento e envelhecimento acelerado em ambos ambientes; (D) Relação entre potenciais de inóculo e envelhecimento acelerado em ambos ambientes; (E) Valores médios de envelhecimento acelerado nos potenciais de inóculo em função das condições de armazenamento. UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

4.2 Análise de sementes de soja inoculadas

4.2.1 Ocorrência de *Phomopsis sojae* em sementes de soja, no decorrer do período de armazenamento

De acordo com a análise da variância conjunta (ANEXO B), houve diferenças significativas pelo teste F ($P \leq 1\%$) entre os três fatores em estudo, em relação às diferentes variáveis testadas, e também se observou efeito significativo na interação tripla para a variável incidência, não havendo interação para a germinação, envelhecimento acelerado e condutividade (ANEXO B). O modelo ajustado foi significativo para todas as variáveis analisadas, a correlação de Pearson entre o resíduo e a curva da distribuição normal foi positiva, e de acordo com o gráfico da qq plot, houve a normalidade.

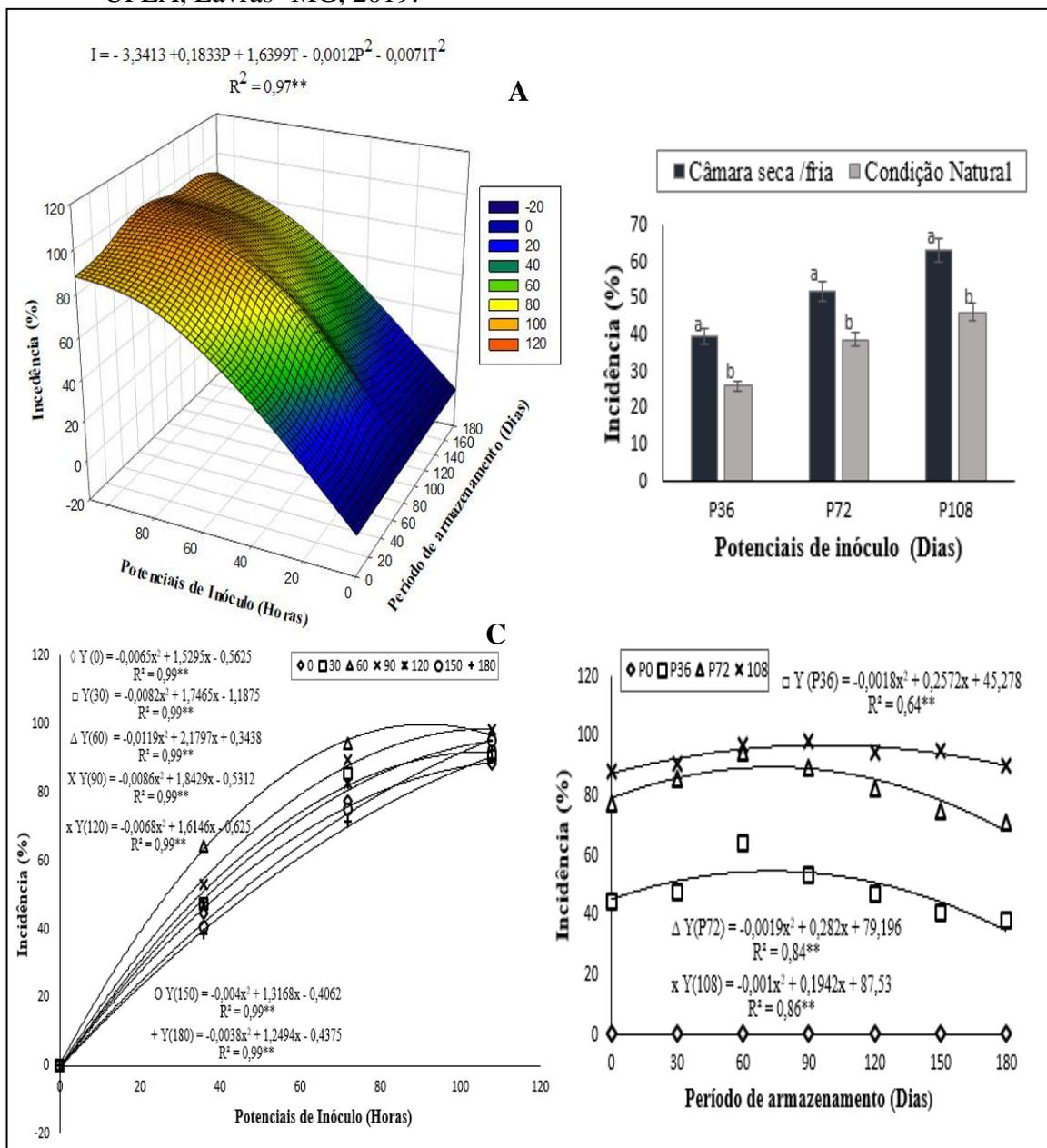
Para a variável incidência do fungo, o efeito significativo entre condições de armazenamento x período de armazenamento x potencial de inóculo, em ambas as condições de armazenamento, indica que os fatores atuam de forma simultânea sobre a incidência do fungo *Phomopsis sojae* nas sementes de soja, isto é, a redução da incidência de *Phomopsis sojae* em sementes de soja foi influenciada pelos potenciais de inóculo e dias de armazenamento (FIGURA 7A e FIGURA 8A). Houve manutenção da incidência do fungo na câmara fria e seca em função dos potenciais do inóculo e período de armazenamento (FIGURA 7A), e redução da incidência, embora não acentuada, na condição natural em função dos potenciais de inóculo ao longo do armazenamento (FIGURA 8A). Não se observou efeito significativo do restritor hídrico manitol sobre a qualidade fisiologia das sementes de soja.

De acordo com os resultados, independentemente das condições de armazenamento das sementes inoculadas, os maiores valores de potenciais de inóculo proporcionaram maiores valores médios de incidência do fungo *Phomopsis sojae* ao longo de todo o período de armazenamento (FIGURA 7D), e na condição de câmara fria e seca houve manutenção de valores mais elevados de incidência do fungo em todos os potenciais de inóculo quando comparado com o armazenamento em condição natural (FIGURA 7B).

Observa-se de acordo com as Figuras 7C e 7D, que nesta condição de armazenamento a incidência do fungo encontra-se acima de 50% até 180 dias de armazenamento nos potenciais de inóculo P72 e P108, quando comparado com as condições de ambiente não

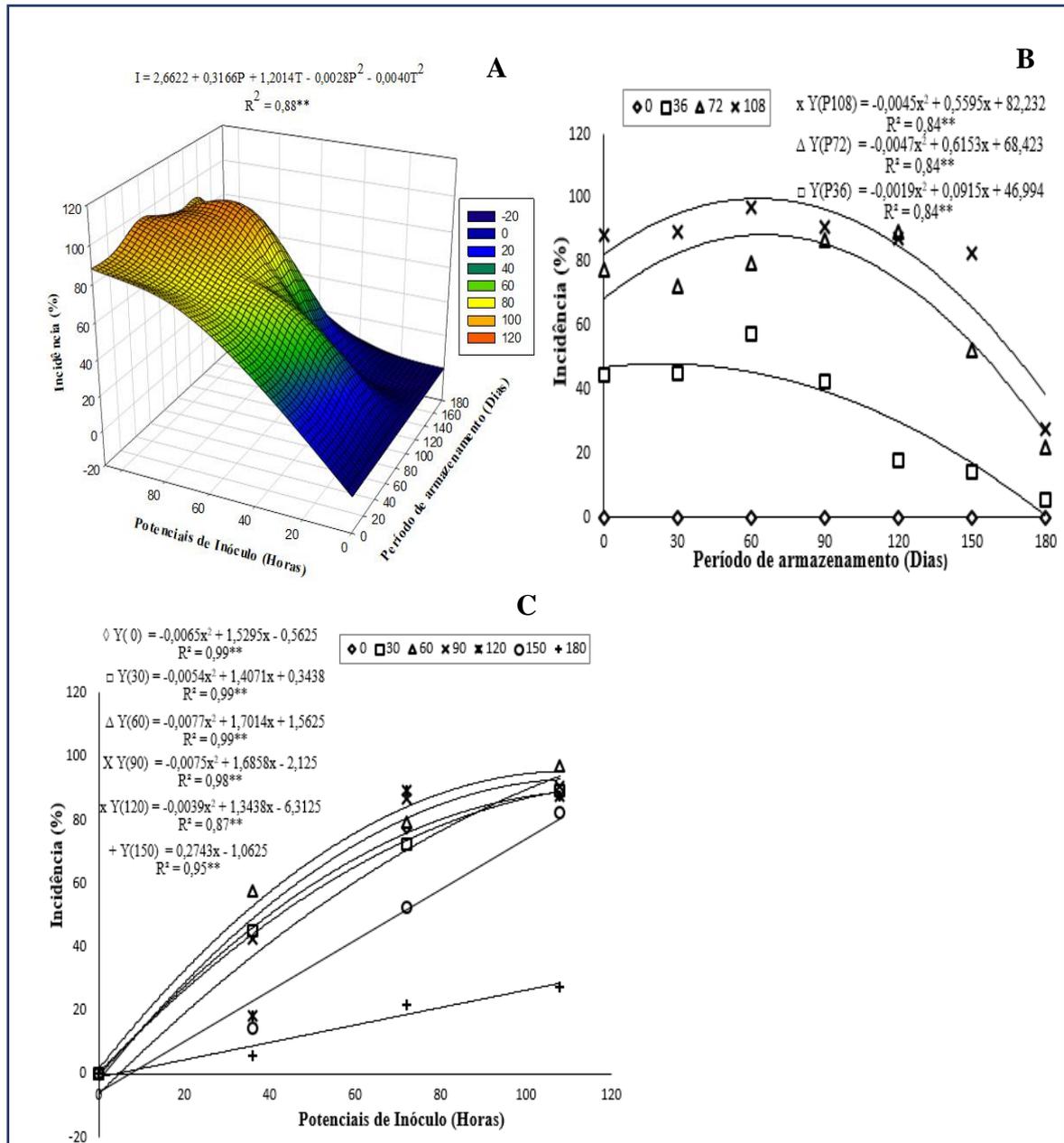
controlado que mantém este nível de incidência até 150 dias nos mesmos potenciais de inóculo (FIGURA 8B).

Figura 7 - Incidência (%) de *Phomopsis sojae* em sementes de soja inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas), diferentes períodos de armazenamento (Dias) e armazenadas sob câmara fria e seca: (A) Superfície de resposta referentes a incidência (%) em função dos potenciais de inóculo (Horas) e períodos de armazenamentos (Dias); (B) Valores médios de incidência nos potenciais de inóculo em função das condições de armazenamento; (C) Relação entre potenciais de inóculo e incidência nos meses de armazenamento; (D) Relação entre período de armazenamento e incidência nos diferentes potenciais de inóculo (Horas). UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 8 - Incidência (%) de *Phomopsis sojae* em sementes de soja inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas), diferentes períodos de armazenamento (Dias) e armazenadas sob condição natural: (A) Superfície de resposta referentes a incidência (%) em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (B) Relação entre período de armazenamento e incidência nos diferentes potenciais de inóculo (Horas); (C) Relação entre potenciais de inóculo e incidência nos meses de armazenamento. UFLA, Lavras- MG, 2019.



Do autor (2019).

Estes resultados comprovam as observações de Wetzel et al. (2004), no estudo sobre a longevidade de *Phomopsis sojae* durante o armazenamento no germoplasma de soja, os autores observaram redução total de incidência do fungo nas sementes, após 12 meses de

armazenamento em condição de laboratório, na temperatura 18-28 °C, umidade 30-90%; e nas condições de armazenamento em câmara fria e seca (12 °C e 30%) e congelamento (-18 °C) observaram redução na ordem de 60% de incidência no mesmo período de armazenamento.

Os referidos autores também confirmaram que o armazenamento das sementes inoculadas em temperaturas de condição natural, sem controle de umidade, ou com maior variação da umidade relativa, não oferecem condições favoráveis a manutenção da viabilidade do fungo (WETZEL et al., 2004).

Com base nos dados da Figura 7D, observa-se também que, a incidência do fungo manteve-se quase constante em todos os potenciais de inóculo na câmara fria e seca, isto é, não se observou grandes variações da ocorrência do fungo no início e até 180 dias de armazenamento. A porcentagem de incidência para cada potencial de inóculo foi de 44,3% (P36); 77,5% (P72); 88,1% (P108), decorridos 180 dias do armazenamento observa-se a manutenção desta incidência nos mesmos potenciais de inóculo com percentuais de 38,33 % (P36); 71,2 % (P72) e 90 % (P108).

A mesma tendência de resultados foi observada por Wetzel et al. (2004), em estudos nesta linha de pesquisa, nos quais foi verificado a manutenção da incidência do fungo *Phomopsis sojae* nas condições frias e secas durante 18 meses de armazenamento, sendo a média de ocorrência inicial de 60% e após 18 meses 61%, decrescendo após 32 meses de armazenamento para 16%, e 40 meses para 2%.

Na condição de ambiente natural a incidência do fungo foi crescente até 60 dias, após este período houve redução significativa, sendo que, no início do armazenamento, as incidências por potenciais de inóculo foram de 44,3% (P36); 77,5% (P72); 88,1% (P108), e decorrido 180 dias houve um decréscimo acentuado desta incidência inicial em todos os potenciais de inóculo tais como: P36: 5% (P36); 21,8% (P72); 27,5% (P108) (FIGURA 8C).

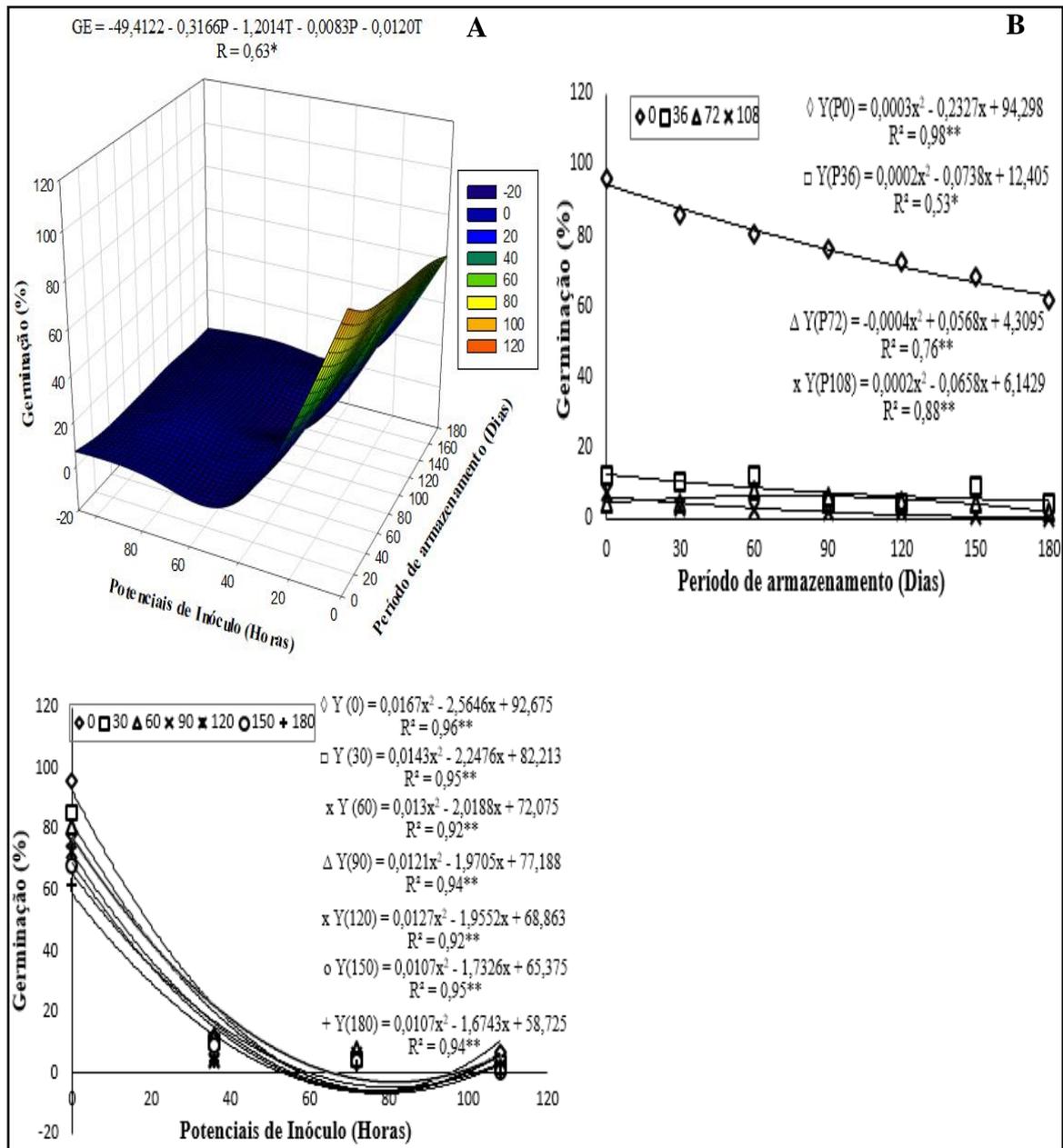
Estes resultados revelam mais uma vez a influência das condições de armazenamento na sobrevivência e manutenção da viabilidade de patógeno em sementes, conforme comunicado por Wetzel et al. (2004), o armazenamento de sementes inoculadas sem controle de temperatura e umidade ou com maior variação desses fatores. são condições desfavoráveis a manutenção e viabilidade do fungo.

4.2.2 Germinação das sementes ao longo do armazenamento

Não houve diferenças significativas ($P \leq 1\%$) da percentagem de germinação das sementes soja em relação as condições de armazenamento das sementes, bem como não houve influência do período de armazenamento, potenciais de inóculo e condições de armazenamento sobre a germinação de sementes de soja, isto é, a germinação das sementes nos potenciais de inóculo ao longo do período, foi quase nula em ambos os ambientes (FIGURA 9A). Porém, no tratamento controle (sementes não inoculadas), houve relação do período de armazenamento sobre a germinação de sementes de soja. Neste tratamento, com o armazenamento das sementes, a percentagem de germinação decrescia em ambos os ambientes (FIGURA 9B). Também foi observado que as sementes não inoculadas (P0) mantinham os valores de percentagem de germinação em níveis altos em ambos os ambientes, em todos os períodos de armazenamento, quando comparados com as sementes inoculadas (FIGURA 9C).

A inexistência de diferença significativa da germinação, independentemente das condições de armazenamento nos potenciais de inóculo, pode ser atribuída, em parte, à sensibilidade diferenciada do método Rolo de Papel utilizado neste trabalho, cujos valores de germinação podem ser subestimados segundo estudos realizados por Henning (2004), Goulart (2018) e Machado (1988). Embora seja um método descrito e recomendado nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), para sementes de soja, tem sido demonstrado que o contato direto do tegumento contaminado com *P. sojae* e os cotilédones das sementes por período de 7 dias, faz com que o fungo seja favorecido em sua ação parasitária, determinando a morte das sementes nestas condições. Uma alternativa para solução deste problema é o uso de outros métodos de germinação, como a emergência em areia, que evita o contato do tegumento e cotilédones por períodos mais prolongados durante o desenvolvimento do teste.

Figura 9 - Germinação (%) em sementes de soja inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas de inóculo), diferentes condições de armazenamento (câmara fria e seca e condição natural) e diferentes períodos de armazenamento (dias): (A) Superfície de resposta referentes a germinação (%) em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (B) Relação entre período de armazenamento e germinação nos diferentes potenciais de inóculo (Horas); (C) Relação entre potenciais de inóculo e germinação nos meses de armazenamento. UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

4.2.3 Avaliação da viabilidade pelos testes de vigor

4.2.3.1 Condutividade elétrica das sementes ao longo do armazenamento

Não houve interação tripla ($P \leq 5\%$) entre a condição de armazenamento, período de armazenamento e potencial de inóculo sobre a condutividade elétrica. Porém, houve relação entre o período de armazenamento e o potencial de inóculo sobre a perda de integridade da membrana da semente e liberação de íons (ANEXO B). Em ambos os ambientes de armazenamento, a condutividade elétrica foi crescendo com o aumento do potencial de inóculo até aos 90 dias, após este período, houve redução (FIGURA 10A e FIGURA 10B).

A redução da liberação de íons após 90 dias de armazenamento, em ambas as condições de armazenamento, nos diferentes potenciais, pode ser explicada pela reorganização das estruturas da membrana celular das sementes com a perda de umidade, reduzindo os níveis de liberação inicial.

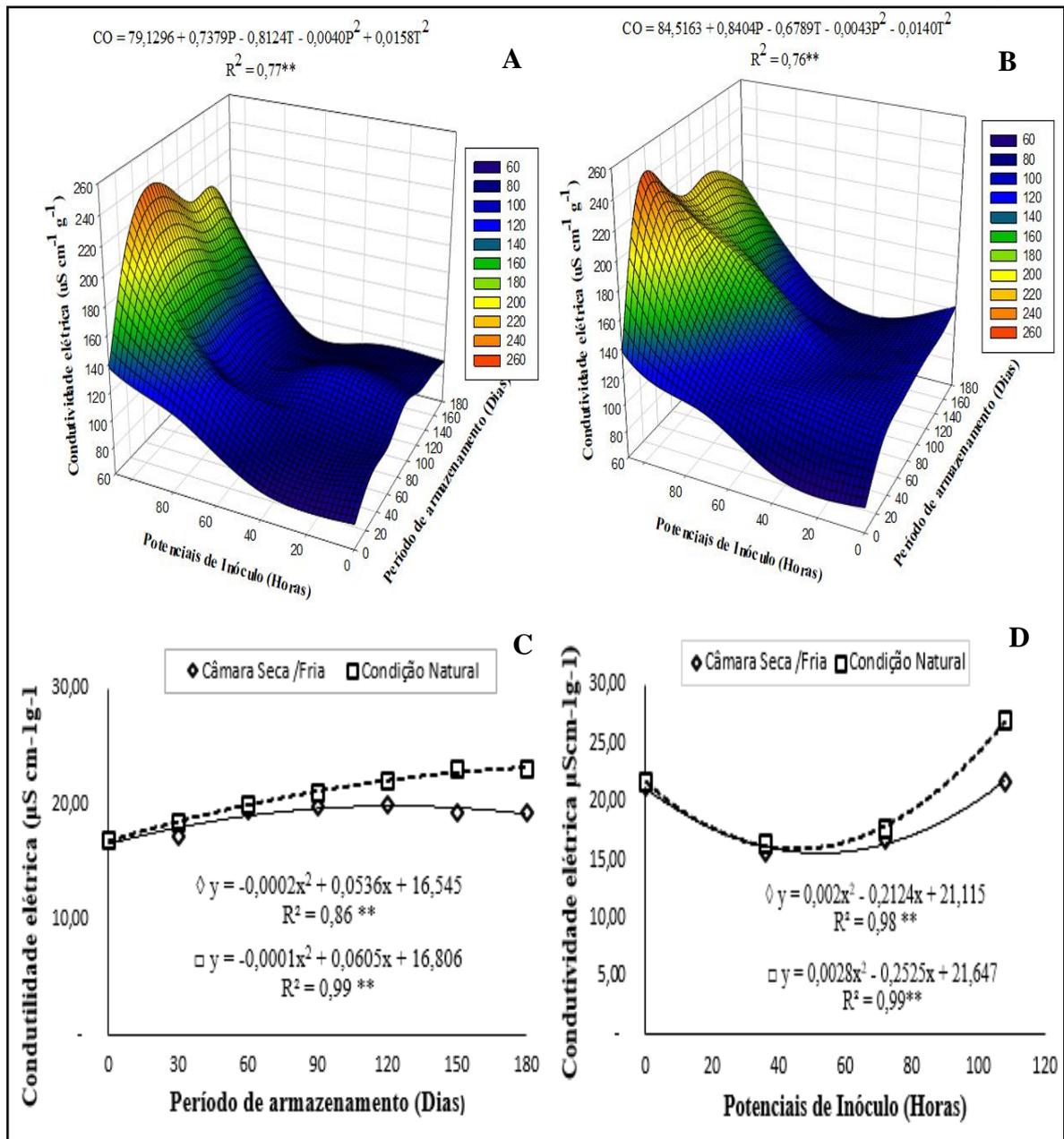
Esta informação é sustentada por Fessel et al. (2010), os autores afirmam que com o passar do tempo de embebição após o armazenamento das sementes de soja, a condutividade pode reduzir com a reorganização da membrana retornando à configuração estável.

Na câmara fria e seca ao zero dia de armazenamento, a condutividade das sementes foi em média $137.4 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$, após 180 dias aumentou para $168.3 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$, na condição natural, no mesmo período de armazenamento observou-se no início $137.4 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de íons liberados e, no final do armazenamento, um aumento de $182.4 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (FIGURA 10C).

Portanto, a condição natural proporcionou maiores valores de liberação de íons em sementes de soja quando comparados com a câmara fria e seca, o que indica a perda de integridade da membrana celular da semente resultante da deterioração (FIGURA 10D).

Estes resultados confirmam, de certa forma, estudos anteriores nesta linha de pesquisa, pelos quais a condutividade elétrica em sementes de soja armazenadas aumenta em função das temperaturas em que forem submetidas, isto é, quando as sementes de soja são armazenadas em temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e variação da temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ }^\circ\text{C}$, independentemente da qualidade fisiológica e sanitária inicial das sementes, há uma influência na deterioração das sementes e, conseqüentemente, maior liberação de íons quando comparado com temperatura $10 \text{ }^\circ\text{C}$ e sem variação de temperatura (FESSEL et al., 2010).

Figura 10 - Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) em sementes de soja inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas), diferentes condições de armazenamento (câmara fria e seca e condição natural) e diferentes períodos de armazenamento (dias): (A) Superfície de resposta referentes à condutividade elétrica em sementes de soja armazenadas sob câmara fria e seca em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (B) Superfície de resposta referente à condutividade elétrica em sementes de soja armazenadas sob condição natural em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (C) Relação entre período de armazenamento e condutividade elétrica em ambos ambientes; (D) Relação entre potenciais de inóculo e condutividade elétrica em ambos ambientes. UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

4.2.3.2 Avaliação do envelhecimento acelerado ao longo do armazenamento

Não houve diferença significativa das condições de armazenamento sobre a germinação após o envelhecimento acelerado de sementes de soja inoculado de acordo com o teste F ($P \leq 5\%$), bem como não houve influência dos fatores período de armazenamento, potencial de inóculo e condições de armazenamento sobre a germinação após envelhecimento acelerado das sementes de soja, isto é, a germinação após envelhecimento acelerado nos potenciais de inóculo ao longo do período de armazenamento foi quase nula em ambos os ambientes (FIGURA 11A). Porém, houve relação do período de armazenamento e potencial de inóculo sobre a germinação após envelhecimento acelerado (ANEXO B).

Nas sementes não inoculadas (P0), houve uma relação significativa do período de armazenamento sobre a germinação após envelhecimento acelerado das sementes de soja. Neste tratamento, com o armazenamento das sementes, a percentagem de germinação após o envelhecimento acelerado decresceu em ambos ambientes (FIGURA 11B). Também foi observado que as sementes não inoculadas (P0) mantiveram os valores de percentagem de germinação em níveis altos em ambos os ambientes, em todo o período de armazenamento, quando comparadas com as sementes inoculadas, embora abaixo dos 50% após 90 dias de armazenamento (FIGURA 11C).

O percentual de germinação das sementes inoculadas em todos os potenciais de inóculo foi reduzido drasticamente após o envelhecimento acelerado, quando comparado com o tratamento não inoculado (P0) (FIGURA 11B), o que indica não só efeito da temperatura e umidade na deterioração da semente, mas também o efeito do fungo na degradação da membrana e tecidos vivos, resultando em morte da semente

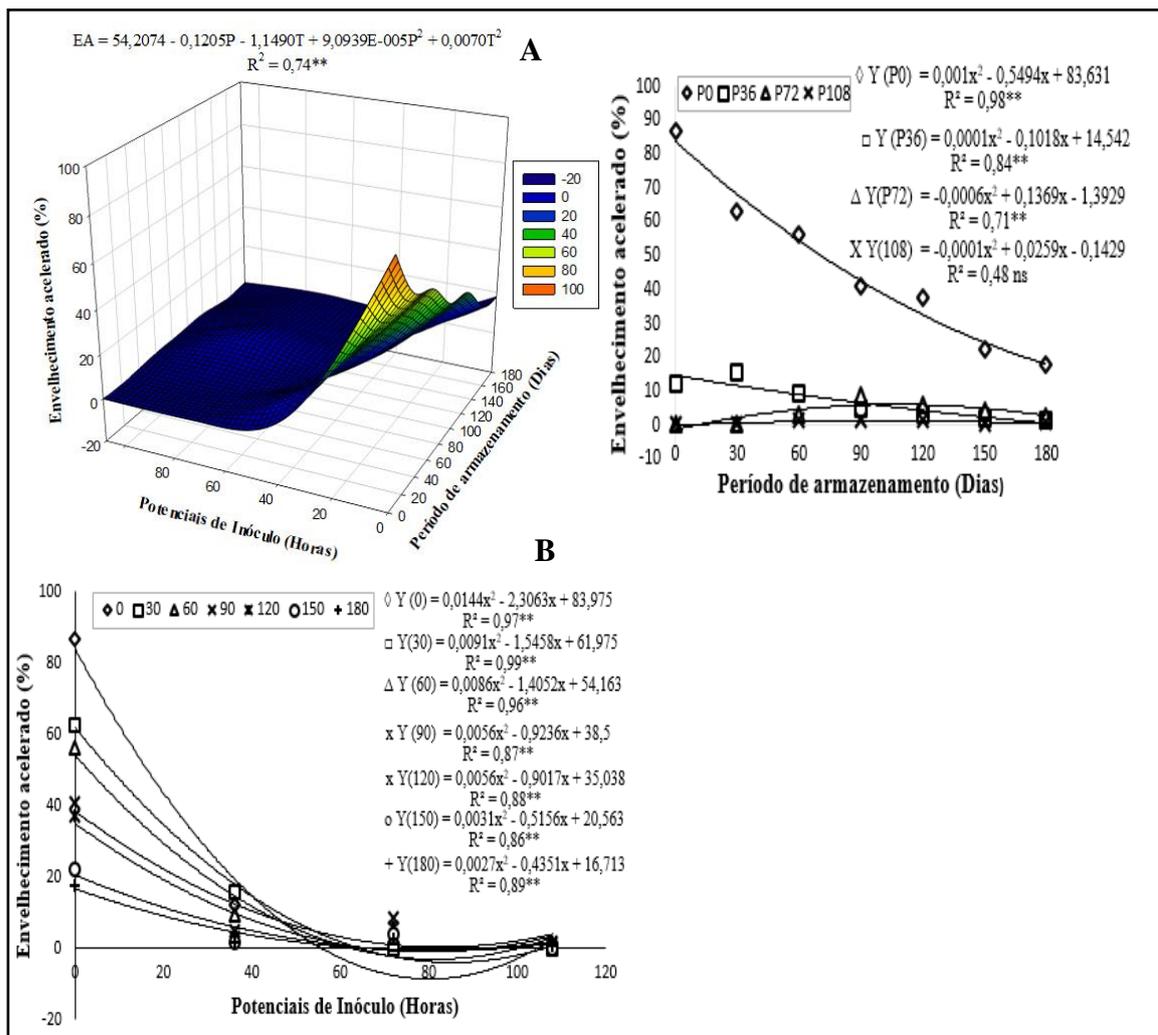
O efeito drástico da germinação após o envelhecimento acelerado era de se esperar, pois comprova o efeito deste teste na deterioração das sementes pelo aumento das atividades metabólicas devido à elevação da temperatura e umidade, ocasionando morte das sementes.

Estes resultados foram comprovados por Dias e Marcos Filho (1996), que relataram que a exposição das sementes à elevada temperatura e umidade, provoca sérias alterações degenerativas no metabolismo da semente, desencadeando a desestruturação e perda da integridade do sistema de membranas celulares, ocasionando perda da qualidade da semente.

Da Silva e Da Silva (2000) afirmam que as condições impostas pelo teste de envelhecimento artificial não agiriam apenas no comportamento das sementes, mas também influenciariam na ação de microrganismos participantes da deterioração.

Entretanto, a exemplo do que foi relatado para os resultados do teste de germinação via Rolo de Papel, o teste de envelhecimento acelerado, que emprega também este método, faz com que os resultados de germinação das sementes sejam subestimados.

Figura 11 - Envelhecimento acelerado (%) em sementes de soja inoculadas sob diferentes potenciais de inóculo (Horas de inóculo), diferentes condições de armazenamento (câmara fria e seca e condição natural) e diferentes períodos de armazenamento (dias): (A) Superfície de resposta referentes a envelhecimento acelerado em função dos potenciais de inóculo (Horas) e período de armazenamento (Dias); (B) Relação entre período de armazenamento e envelhecimento acelerado nos diferentes potenciais de inóculo (Horas); (C) Relação entre potenciais de inóculo e envelhecimento acelerado nos meses de armazenamento. UFLA, Lavras- MG, 2019.



Fonte: Do autor (2019).

5 CONCLUSÕES

As condições de armazenamento, potenciais de inóculo e período de armazenamento, apresentaram forte e variável influência na viabilidade (incidência) dos fungos inoculados em sementes de milho e soja.

A incidência do fungo *Stenocarpella maydis* permaneceu em níveis superiores a 50% até 90 dias de armazenamento em câmara fria e seca, nos potenciais de inóculo mais elevados P72 (62,5%) e P108 (63,1%). Nas condições naturais de armazenamento, esse nível de incidência se manteve até 60 dias nos mesmos potenciais P72 (65%) e P108 (81,8%).

Com a queda de incidência do fungo *Stenocarpella maydis* em sementes de milho, ao longo do armazenamento houve um leve incremento do percentual de germinação das sementes, confirmados pelo teste de vigor tanto em câmara fria e seca quanto em condição natural.

Para o patossistema *Phomopsis sojae* – soja, a incidência do fungo apresentou tendências de manutenção dos valores iniciais em condições de câmara fria e seca. Para condição natural houve queda na incidência do fungo aos 180 dias da ordem de 88% no potencial de inóculo P36, 28% no potencial P72, e 69% no potencial P108.

O percentual de germinação de soja portadora de *P. sojae* em câmara fria/seca apresentou redução média de cerca de 67% entre os potenciais de inóculo, e em ambiente natural 64%. O vigor das sementes avaliadas pelo envelhecimento acelerado apresentou resultados com tendência semelhante à germinação padrão. Por sua vez, os resultados do teste de condutividade elétrica indicaram que a qualidade fisiológica das sementes foi mantida nos mesmos níveis iniciais em ambos os ambientes de armazenamento.

REFERÊNCIAS

- ARIF, M.; JAN, M.T.; MIAN, I.A.; KHAN, S.A.; HOLLINGTON, P.; HARRIS, D. Evaluating the impact of osmopriming varying with polyethylene glycol concentrations and durations on soybean. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 16, p. 359-364, 2014.
- BASU, R.N. Seed Viability. In: BASRA, A.S. (Ed.) **Seed Quality basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products Press, 1994. p. 1-44.
- BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. **Proceedings...** Passo Fundo: EMBRAPA; ABRATES, 1987. p. 93-112.
- BLACK, M.; BEWLEY, J.D. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BRAGANTINI, C.; GOIÁS, S.A. **Alguns Aspectos do Armazenamento de Sementes e Grãos de Feijão**. Documentos 18. Santo Antônio de Goiás: Embrapa. Dezembro de 2005. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/194008/1/doc187.pdf>>. P: 16 e 28. 2005. Acesso: 20 jan. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretária de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA, 2009. 399 p.
- CARVALHO, E.D. Qualidade fisiológica de sementes de milho sob diferentes condições de armazenamento. **Scientia Agraria Paranaensis**, [S.l.], v. 9, n. 3, p 58-65, 2010.
- CARVALHO, J.C. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*)** 1999. 44 p. Dissertação (Mestrado Agronomia /Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1999.
- CARVALHO, E.M.; MACHADO J.C.; VON PINHO E.V.; POZZA E.A.; PRADO, P. E. Relação do tamanho de sementes de milho e doses de fungicida no controle de *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 29, p. 389-393, 2004.
- CARVALHO, L.F.; MEDEIROS FILHO, S.; ROSSETTI, A.G.; TEÓFILO, E.M. Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.l.], v.22, n.1, p.185- 192, 2000.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, p. 427-439, 2006.
- CASA, R.T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. **Fungos associados a semente de milho produzida nas Regiões sul e sudeste do Brasil**. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23. p. 370-373, 1998.

CASA, R.T. ***Diplodia maydis e Diplodia macrospora* associados à semente de milho.** 1997. 145 p. Dissertação (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

CASA, R.T. **Sobrevivência de *Stenocarpella maydis e Stenocarpella macrospora* em restos culturais de milho.** 2000. 145 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora e Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28.p :355-361, 2003.

CASELA, C.; FERREIRA, A.; DE ALMEIDA, N. **Doença na Cultura do Milho.** (Circular Técnica 83). Sete Lagoas: Embrapa, dez. 2006. p. 5, 6 e 13. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/490415>>. Acesso em: 05 maio 2019.

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. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

COSTA, C. **Armazenamento e conservação de sementes de espécies do cerrado.** Documento 265. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2009. p 11-12.

COSTA, M. L; MACHADO, J. da C. Inoculação de *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras. v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2004.

COTA, L.V.; DA SILVA, D.D.; DA COSTA, R.V. **Helmintosporiose Causada por *Exserohilum turcicum* na Cultura do Milho.** (Circular técnica 195). Sete Lagoas: Embrapa, dezembro de 2013. p. 2. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/>>. Acesso: 12 mar. 2018.

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. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2000.

DA SILVA, M.; DA SILVA, W. Comportamento de Fungos e de Sementes de Feijoeiro Durante o Teste de Envelhecimento Artificial. **Pesquisa. Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 599-608, mar. 2000.

DE FREITAS, M.A. **Variabilidade, danos e detecção de *Stenocarpella maydis e Stenocarpella macrospora* em sementes de milho.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Tese/Dissertação (ALICE).

- DIAS, D.C.F.S.; MARCOS FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Scientia Agrícola**, v. 53, n. 1, p. 1-11, 1996.
- FARIA, G. de. **Condicionamento fisiológico e armazenamento de sementes de girassol**. 2015. 79 p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2015.
- FARONI, A; BARBOSA, G; CARDOSO, F. Avaliação da qualidade e quantidade do milho em diferentes condições de armazenamento. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v.13, n. 3, 193-201, jul. /set. 2005.
- FESSEL, S.A.; PANOBIANCO, M.; DE SOUZA, C.; VIEIRA, R. Teste de Condutividade Elétrica em Sementes de Soja Armazenadas sob Diferentes Temperaturas. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 1, p. 207-214, 2010.
- FESSEL, S.A.; VIEIRA, R.D.; RODRIGUES, T.J.D.; FAGIOLI, M. Germinação de sementes de alface submetidas ao condicionamento osmótico durante o armazenamento. **Scientia agrícola**, [S.l.], v.59, n.1, p.73-77, 2002.
- FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Diacom**: diagnóstico completo da qualidade de sementes de soja. Londrina: Embrapa/CNPSO, 1992. 22 p. (Circular Técnica, 10).
- FREITAS, M. Influência do Armazenamento de Semente de milho e Soja e Qualidade de Plantio. Agro ciência. Divisão Agrícola da DowDuPont. Blog. **Agronegócio em Foco**, 24 de agosto de 2018. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/blog/59/a-influencia-do-armazenamento-de-sementes-na-qualidade-de-plantio>>. Acesso: 02 fev. 2019.
- FRIGERI, T. **Interferência de patógenos nos resultados dos testes de vigor em sementes de feijoeiro**. 2007. 91 p. Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2007.
- GALLI, J.A.; PANIZI, R.C.; VIEIRA, R.D. Sobrevivência do patógenos associados as sementes de soja armazenadas durante seis meses. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2. p 205- 213, 2007.
- GIURIZATTO, M.I.K.; ROBAINA, A.D.; GONÇALVES, M.C.; MARCHETTI, M.E. Qualidade fisiológica de sementes de soja submetidas ao hidrocondicionamento. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 30, supl. p. 711-717, 2008.
- GOULART, A.C. **Fungos em Sementes de Soja: Detecção e Importância**. Documentos, 11. 2 ed. Dourados: Embrapa-CPAO, 2018. p. 12. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso: 28 abr. 2018.
- GUIMARÃES, M.R.F. **Avaliação do potencial de inóculo de patógenos em sementes: Sua Relação com a Qualidade Fisiológica e Quantificação do DNA fúngico por qPCR** 2016. 42 p. Dissertação. (Mestrado em Fitopatologia) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2016.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de semente:** Noções gerais. Documentos, 264. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.17-18.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes:** Noções gerais. Documentos, 264. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja. 2004, p.15-16.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P.; FERREIRA, L.P.; CONSTAMILAN, L.M. **Manual de identificação de doenças em soja.** Documento 256. 1. ed. Londrina: Embrapa, 2005. 43 p.

HENNING, A.; NETO, F.; COSTA, N. Efeito da Época de Tratamento Químico e/ou período de armazenamento sobre a qualidade Fisiológica e Sanitário das Sementes de Soja cultivar Paraná com alto índice de *Phomopsis sp.* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES. **Resumo...** Brasília, ABTATES, p. 24. 1981.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia.** Doenças das plantas Cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda., 1997. v. 2. p. 516, 596.

KUHENM JUNIOR, P.R. **Indução da esporulação de *Stenocarpella maydis*.** 2009. p. 18, 22, 23. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 2009.

LIMA, P.P. **Métodos de inoculação e localização de inóculo de *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* em sementes de feijão.** 2015. 57 p. Dissertação (Mestrado Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2015.

LOPES, H.M.; FONTES, P.C.R.; MARIA, J.; CECON, P.R.; MALAVASI, M. de M. Germinação e vigor de sementes de cebola (*Allium cepa L.*) influenciados pelo período de temperatura de condicionamento osmótico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 173-179, 1996.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes, fundamentos e aplicação.** Ciências Agrárias nos Trópicos Brasileiro. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1988. p. 20-34.

MACHADO, A.Q.; MACHADO, J.C. Estudo da relação entre o potencial de inóculo de *Fusarium verticilloide (syn F.moniliforme)* e o desempenho de sementes de milho por meio da técnica de restrição hídrica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTE. 2002, 7., **Anais...** Sete lagoas, Embrapa, 2002. p .453.

MACHADO, J.C.; LANGERAK, C. **General incubation methods for routine seed health analysis. Ed. Seed Borne Fungi:** a contributon to routine seed health analysis. Bassersdorf, CH-Switzerland: ISTA, 2002. p. 48-80.

MACHADO, J.C.; BARROCOS, E.N.; COSTA, M.L.; GUIMARAES, R.; MACHADO, C.F. Uso de técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **RAPP**, [S.l.], v. 19. p 1-22, 2011.

- MACHADO, J.C.; COUTINHO, W.M.; GUIMARÃES, R.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; FERREIRA, D.F. Use of osmotic solutes to control seed germination of rice and common bean in seed health blotter tests. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 36, n. 1, p. 66-75, 2008.
- MACHADO, J.C.; DE OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.D.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de sementes**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 62-67, 2004.
- MACHADO, J.C.; DE OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.D.C. Controle da Germinação de Sementes de Soja em Testes de sanidade pelo uso da Restrição Hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.l.], v. 25, n. 2, p. 77-81, 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, 2001a.
- MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; OLIVEIRA, J.A.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungo sem sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001b.
- MAGALHÃES, F.H.L. **Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações**. 200. 139 p. Tese (Agronomia /Fitopatologia) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, 1994. p. 133-150.
- MAXIMIANO, C.V. **Pré-condicionamento de sementes de milho em água com diferentes concentrações de ozônio no desenvolvimento inicial de plantas e no controle *Fusarium spp.*** 2017.55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2017.
- MC DONALD, M.B.; GUPTA, I.J.; SCHMITTHENNER, A.F. Effect of storage fungi on seed vigour of soybean. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 21, n. 3, p. 581-591, june. 1993.
- MERONUCK, R.A. The significance of fungi in cereal grains. **Plant Disease**, v. 71, p. 287-291, 1987.
- MORGAN, J.G. The *Diaporthe phaseolorum* complex of soybean. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 17, p. 359-367, 1992.
- NETO, J.C. **Influência de métodos de inoculação de *Stenocarpella maydis* em híbridos e na qualidade de sementes de milho**. 2013. 62 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013.
- OLIVEIRA, A.B.; GOMES-FILHO, E. Efeito do condicionamento osmótico na germinação e vigor de sementes de sorgo com diferentes qualidades fisiológicas. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.l.], v.32, n.3, p. 25-34, 2010.

PALLAORO, D.S. **Condicionamento fisiológico na qualidade de sementes de milho**. 2016. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, 2016.

PLAZAS, I.A.Z.; MEDINA, P.F.; NOVO, J.P.S. Viabilidade de sementes de trigo tratadas com fenitrotion e infestadas por *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) durante o armazenamento. **Bragantia**, [S.l.], v. 62, n. 2, p. 315-327, 2003.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Milho: manejo integrado de doenças. In: FANCELLI, A.L. DOURADO NETO, D. (Eds.). **Milho: tecnologia e produtividade**. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2001. p. 223-237.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BRESOLIN, A.C.R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. rev. atual. Lages: Graphel, 2004. 144 p.

ROSSETTO, C.A.V.; BRAZ, M.R.S. Condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes armazenadas de café. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 38, n. 7, p. 1849-1856, 2008.
SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.l.], v. 27, n.1, p.104-114, 2005.

SCOLARI, T.; BONEMO, L. **Qualidade fisiológica de sementes de milho crioulo (*Zea mays* L.) armazenadas em diferentes embalagens e temperaturas**. 21 p. TCC. (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, PR, 2014.

SIQUEIRA, C.S.; BARROCOS, E.N.; MACHADO, J.C. *Transmission of Stenocarpella maydis by maize seeds*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 393-400, 2016.

TANAKA, M.A.S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de Armazenamento de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil, v. 26, n.1, p. 60-64, mar. 2001.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, p. 218-226, 1991.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.; MARIANNO, M. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 15, p. 232-237, 1989.

TANAKA, M.A.S. et al. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Revista Ciências Agrícolas**, v. 58. n. 3, p. 501-508, jun./set. 2000.

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

TEKRONY, D. et al. Effect of date of harvest maturity on soybean seed quality and *Phomopsis* sp. infection. **Crop Science**, Madison, v. 24, n. 1, p.189-193, 1984.

TORMEN, N.R. **Incidência da seca da haste da soja (*Diaporthe phaseolorum var. sojae*) em função do espaçamento entre linhas, cultivar e aplicação de fungicida**. 2004. 69 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 4, p. 1-26.

WETZEL, M.; DE FONTE, A.; GOMES, M.; ROCHA, V. **Longevidade de *Phomopsis sojae* Lehman durante o armazenamento de germoplasma de soja**. Brasília: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 63, mar. 2004. p. 7- 16.

WICKLOW, D.T.; WEAVER, D.K.; THRONE, J.E. Fungal colonists of maize grain conditioned at constant temperatures and humidities. **Journal Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 355-361, 1998. Disponível em: <<http://ddr.nal.usda.gov/dspace/handle/10113/13247>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

WILSON JR., D.O. The storage of orthodox seeds. In: BASRA, A.S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products Press, 1994. p.173-207.

ANEXO A

Tabela 1 - Anava conjunta dos efeitos dependente e independente dos fatores em relação as variáveis testadas nas sementes de milho inoculado.

FV	GL	QM			
		Incidência	Condutividade	Germinação	Envelhecimento
Condições de Armazenamento	1	6644.6 ***	205.5***	196.8 ns	4959.4***
Período de Armazenamento	6	12880.4***	70.3***	396.4***	625.7***
Potencial de inóculo	3	167.61***	851.4***	24958.5***	30114.5***
Cond. Armaz x Período Armaz	6	499.5***	27.9***	176.9**	45.7***
Cond. Armaz x Potenc. Inóculo	3	774.1***	89.3***	914.1***	342.7***
Período. Armaz x Potenc. Inóculo	18	1663.2 ***	16.6***	334.6***	610.9***
Cond .Armaz x Período.Armaz x Potencial de Inóculo	18	247.9 ***	12.3***	77.7ns	32.7ns
Residuals	168	31.2	7.1	111.6	81.7
Total	223				
CV		6.7 %	12.4 %	2,2%	4.9 %

***Diferenças significativo a 1%; **significativo a 5%; * significativo a 10%; ns não significativo

Fonte: Do autor (2019).

ANEXO B

Tabela 1 - Anava conjunta dos efeitos dependente e independente dos fatores em relação as variáveis testadas nas sementes de soja inoculado.

FV	GL	QM			
		Incidência	Condutividade	Germinação	Envelhecimento
Condições de Armazenamento	1	6172.2***	7091.6***	270.1ns	54.0 ns
Período de Armazenamento	6	2994.5***	7900.9***	6082.9***	482.6***
Potencial de Inóculo	3	85799.9***	118264.5***	52634.8***	25570.4***
Cond. Armaz x Período Armaz	6	1193.8***	275.9 ns	367.3***	85.9 ***
Cond. Armaz x Potenc. Inóculo	3	700.4 ***	834.5**	676.6ns	58.3ns
Período. Armaz x Potenc. Inóculo	18	540.9***	1334.8***	1498.1***	1167.7***
Cond.Armaz x Período Armaz. x Potencial de Inóculo	18	288.4***	395.3ns	250.5ns	3.5 ns
Residuals	168	18.984	14.79	20.48	29.31
Total	223				
CV		3.42 %	1.86%	6.21 %	15.58 %

***Diferenças significativo a 1%; **significativo a 5%; * significativo a 10%; ns não significativo
Fonte: Do autor (2019).

ANEXO C

Tabela 1 - Análise de variância da variável incidência de *Stenocarpella maydis* usando tratamento adicional (Tempo de Inoculação, 0h)

Teste: Dunnett						
Trat		Frio(Med)	Dif.(trat)>dms		Natural(Med)	Dif. DMS:11.59
3	108	63,1	(3-4)	Significativo	46,3	Significativa
2	72	52,0	(2-4)	Significativo	38,6	Significativa
1	36	39,5	(1-4)	Significativo	26,1	Significativa

4	0	0,0				

Fonte: Do autor (2019).