

## Avaliação da qualidade sanitária de sementes de milho provenientes do cultivo associado com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*

Ricardo Felipe Braga de Sousa<sup>1</sup>, Vandeir Francisco Gruimarães<sup>1</sup>, Artur Soares Pinto Junior<sup>1</sup>,  
Thiago Henrique Oro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, campus de Marechal Cândido Rondon, PR.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá – UEM, Departamento de Ciências Agronômicas, campus de Umuarama, PR.

r\_felipe\_b@hotmail.com, artur\_bio@hotmail.com, vandeirfg@yahoo.com.br, thiago\_oro@hotmail.com

**Resumo:** A associação do milho com bactérias diazotróficas é um processo que vem sendo cada vez mais utilizado dentro da agricultura, sabendo da propriedade destas bactérias de aumentar a síntese de substâncias que induzem o crescimento, melhorando assim a absorção de água e nutrientes. Após essa associação, criam-se dúvidas sobre a qualidade das sementes, em função de alterações que podem ocorrer pela associação com bactérias diazotróficas. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade sanitária de sementes de milho provenientes do cultivo associado com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Foram utilizadas sementes de milho do cultivar DKB 390<sup>®</sup>, anteriormente tratadas com *Azospirillum brasilense* (estirpe Ab-V5) 0 e 60 kg ha<sup>-1</sup> de adubação nitrogenada; Sementes com *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe SmR1) 0 e 60 kg ha<sup>-1</sup>; e testemunhas 0 e 60 kg ha<sup>-1</sup>, sendo utilizado o método de papel filtro com congelamento para as avaliações. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado fatorial, sendo seis tratamentos provenientes do manejo anterior das sementes. Dentre os resultados apresentados, pode-se observar que o processo de inoculação mostrou-se eficiente no controle de *Giberella* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp.

**Palavras-chave:** bactérias diazotróficas; fisiologia das sementes; sanidade

### Avaluate quality sanitary of maize seeds from a cultivate associated with bacterias from de gender *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*

**Abstract:** The association of the maize with diastrophic bacterias is a process which is more and more used in the agriculture, knowing the properties of these bacterias of increasing the synthesis of substances that induce the growing, improving the absorption of water and nutrients, between them, the nitrogen, considered one of the main elements for the maize culture. After this association, there are doubts about the quality of the seeds, in function of some alterations that may occur by the association with diastrophic bacterias. In the way, this work aimed to evaluate the sanitary quality of maize seeds from a cultivate associated with bacterias from the gender *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. Were used maize seeds from the cultivar DKB 390<sup>®</sup> previously treated with *Azospirillum brasilense* (lineage Ab-V5) 0 and 60 kg ha<sup>-1</sup>; Seeds from *Herbaspirillum seropedicae* (lineage SmR1) 0 and 60 kg ha<sup>-1</sup>; and the control 0 and 60 kg ha<sup>-1</sup>, the sanity test was performed by the method of filter paper with freezing. The experimental design used was a complete random, in factorial scheme, being six treatments from the anterior management of the seeds. Between the presented results, it was observed that the inoculation process was effective in controlling of the *Giberella* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp.

**Key words:** bacterias diazotrophs; seeds physiology; sanity

### Introdução

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo, e sua importância na economia mundial é inerente à sua capacidade e forma de utilização tanto na indústria como na alimentação humana e de animais. De acordo com Fancelli e Dourado Neto (2003), cerca de 70% da produção mundial do cereal destina-se ao consumo animal. No Brasil, este percentual varia de 60 a 80%.

Segundo estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a área plantada com milho na safra 2011/2012 foi de 15, 5 milhões de hectares e a produção total estimada é de 65 milhões de toneladas (Conab, 2012). O cultivo nacional desse cereal nesta última safra será recorde tanto em área como em produção. Esse incremento na produção nacional de milho ocorre devido a vários fatores como: aumento da área cultivada; condições climáticas favoráveis na maioria dos estados produtores; agricultura de precisão, uso de sementes melhoradas e uso e modernização da tecnologia (Conab, 2012).

Para que a produção nacional e a área plantada deste cereal continuem crescendo é imprescindível a difusão da tecnologia entre os agricultores. Nas gramíneas, o nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade e, por isso, em muitas situações, é suprido insuficientemente (Amado *et al.*, 2002). Uma alternativa interessante ao melhor aproveitamento do nutriente seria a associação do milho com bactérias diazotróficas. Essas bactérias se associam as gramíneas atuando na fixação do N atmosférico, na produção de hormônios de crescimento como auxinas e giberelinas, estimulando assim o crescimento vegetal, tanto na parte aérea como das raízes (Dobbelaere *et al.*, 1999).

De acordo com Gracioli (1983), essas bactérias são consideradas promotoras de crescimento, aumentando assim o potencial de desenvolvimento das plantas, devido a capacidade que esses indivíduos apresentam de colonizar as raízes e outros tecidos do vegetal sem causar sintomas de doenças. Este estímulo ao crescimento se dá através de diferentes mecanismos, como a produção de hormônios de crescimento como auxinas e giberilinas e, principalmente, através da fixação biológica de nitrogênio.

Este processo de fixação baseia-se basicamente na conversão do N em  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4$  (formas de N que as plantas conseguem absorver), através de um complexo enzimático, denominado nitrogenase, presente apenas em alguns organismos procariontes, tendo como vantagem o fato de que o processo pode ser realizado em temperatura ambiente e pressão atmosférica (Alves, 2007).

Considerando que o ataque de microrganismos pode afetar o peso, o tamanho e a qualidade das sementes, busca-se sempre a presença de sementes que apresentem elevados índices de sanidade (Carvalho *et al.*, 1993). Os patógenos transmitidos por sementes podem servir de inóculo inicial para o desenvolvimento progressivo da doença no campo, reduzindo o valor comercial da cultura; fazendo com que testes de quarentena e de certificação para o comércio internacional possam ser necessários (Brasil, 2009).

Dentre os fungos de campo e armazenamento veiculados e encontrados nas sementes de milho, o *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus* spp. e *Giberella* spp. são os encontrados com maior frequência devido as condições ambientais apresentadas no país (Reis *et al.*, 1995; Pinto, 1998).

Diante da importância de estudos com o uso de microrganismos em associação com culturas, objetivou-se com este avaliar a qualidade sanitária de sementes de milho provenientes do cultivo associado com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico, equipado com ambiente controlado, pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon - PR.

As sementes utilizadas foram provenientes da cultivar DKB 390<sup>®</sup>, cultivada anteriormente em condições de campo, na safra 2010/2011, na Fazenda Experimental “Prof. Antônio Carlos dos Santos Pessoa”, pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon - PR. As coordenadas geográficas da Fazenda Experimental são: longitude de 54° 22' W, latitude 24° 46' S e altitude média de 420 metros.

Neste experimento as sementes receberam três tratamentos relacionados à inoculação com bactérias diazotróficas: A - Testemunha; B - *Azospirillum brasilense* (estirpe AbV5); C - *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe SmR1); e D - *A. brasilense* + *H. seropedicae* (AbV5 + SmR1). Além da inoculação das sementes foram também testadas duas doses de adubação nitrogenada: 0 e 60 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio.

Para a realização do teste de sanidade foi utilizado o método do papel de filtro com congelamento (Brasil, 2009). As sementes foram incubadas em Caixas Gerbox (caixas de poliestireno cristal, quadradas com 11cm e 3,5cm de altura, contendo tampas), possuindo cada caixa duas folhas de papel germitest umedecidas com 7ml de água destilada. Utilizando então

48 Caixas Gerbox, sendo 8 caixas por tratamento e cada caixa representando uma repetição, com 25 sementes em cada. Estas foram mantidas em ambiente controlado, com temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , em fotoperíodo de 12 horas de luz durante vinte e quatro horas, seguindo-se novamente um período de 24 horas à  $-18^\circ\text{C}$ , e posteriormente retornado às condições iniciais de incubação por período de cinco dias.

Após esse período de incubação a avaliação foi realizada em cada semente individualmente, sob microscópio estereoscópico, sendo a identificação dos fungos feita através de características morfológicas de seu crescimento sobre as sementes e, também pelo microscópio óptico, através de lâminas feitas do material contido nas sementes. Os resultados foram expressos em percentagem de sementes infectadas (Brasil, 2009). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### Resultados e Discussão

Tendo em vista os resultados obtidos quanto à percentagem de infecção das sementes pelos principais fungos de armazenamento da cultura do milho (Tabela 1), percebe-se que entre os principais fungos, o *Penicillium* spp. foi encontrado em maior percentagem mantendo-se presente na maioria das sementes, onde em alguns casos ocorreu a contaminação de 100% dos tratamento, já os fungos *Giberella* spp. e *Fusarium* spp. foram encontrados apenas em algumas sementes apresentando porcentagens menores de infecção (maior percentagem de 55% e 57% respectivamente).

**Tabela 1** - Percentagem de contaminação de sementes de milho (DKB 390®) inoculadas com *Azospirillum brasilense* (estirpe AbV5) e *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe SmR1), reinoculadas com *Azospirillum brasilense* pelos principais fungos de armazenamento

Infecção	Penicillium	Gibberella	Fusarium
	(%)		
Testemunha 0 kg kg ha <sup>1</sup>	98,50 a	41,00 b	36,00 c
Testemunha 60 kg ha <sup>1</sup>	100,00 a	55,00 a	57,00 a
AbV5 0 kg ha <sup>1</sup>	92,00 b	25,00 e	38,00 c
AbV5 60 kg ha <sup>1</sup>	100,00 a	32,00 cd	40,00 bc
SmR1 0 kg ha <sup>1</sup>	96,75 a	35,00 c	45,00 b
SmR1 60 kg ha <sup>1</sup>	97,00 a	28,00 de	40,00 bc
<b>Média</b>	97,50	46,62	45,42
<b>CV (%)</b>	1,75	4,87	8,81

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (P $\leq$  0,05). CV – coeficiente de variação.

Quanto aos tratamentos, as sementes inoculadas com *Azospirillum brasilense* apresentaram menor porcentagem de infecção onde em alguns casos as testemunhas apresentaram valores de infecção 130% maiores do que as sementes inoculadas.

Mariano (2004), trabalhando com bactérias promotoras de crescimento verificou que através da inoculação as bactérias colonizam o local, ocupando assim sítios essenciais para desenvolvimento, resultando em competição e dificultando o acesso dos mesmos ao patógeno, essas bactérias podem atuar no controle biológico influenciando respostas à estresses bióticos e abióticos, assim como no combate a outros microrganismos.

As bactérias promotoras de crescimento geralmente são expostas a condições de alta competição, seja dentro da planta no sistema vascular ou até mesmo na interface solo-raiz, devido a isso as mesmas aprimoraram mecanismos de defesas que favorecem seu desenvolvimento perante outros organismos, como antibióticos, enzimas e bacteriocinas (Sala, 2002).

Moreira e Siqueira (2006), conclui que além desses mecanismos de defesas a capacidade que estas possuem em modificar as propriedades físico-químicas do meio no qual colonizam faz com que exista uma alteração e um determinado controle na flora microbiana do local.

Essa competição interespecífica por espaços intracelulares e nutrientes atribui a essas bactérias a capacidade de pode atuar no controle de organismos fitopatogênicos (Kloepper e Schroth, 1980; Glick e Bashan, 1997).

### Conclusões

Sementes de milho DKB 390 provenientes de cultivo associado a *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* via inoculação das sementes e adubação nitrogenada apresentaram melhor qualidade sanitária quando comparada à testemunha sem inoculação e adubação nitrogenada, apresentando assim menor infecção com fungos de armazenamento *Giberella* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp.

### Referências

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *herpaspirillum* e *burkholderia* em genótipos de milho.** 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendações de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.241-248, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399 p.

CARVALHO. M.L.M. de; BILIA. D.A.C.; SILVA. W.R. d.a; MENEZES. J.R. de. Efeitos do beneficiamento na qualidade das sementes de milho infectadas por *Fusarium moniliforme* Sheld. **Sci. Agric.**, Piracicaba, SP, 50 (2): 295-302, jun/set., 1993.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 212, p 155-164, 1999.

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

GLICK, B.R., BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, n.02, p.353-378, 1997.

GRACIOLI, L.A.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A.P. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (*saccharum* sp.). **Revista Microbiológica**. São Paulo. Nº14, p.191 a 196, 1983.

KLOPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**. v.1, p.642-644,. 1980.

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da.; ASSIS, S. M. P. de.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. *Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças para uma agricultura sustentável*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, vol. 1, p.89-111, 2004.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. 2006. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. UFLA, Lavras, Brasil. 729 p.

PINTO, N.F.J.A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1998. 44p. (Circular Técnica, 29).

REIS, A.C.; REIS, E.M.; CASA, R.T.; FORCELINI, C.A. Erradicação de fungos patogênicos associados a sementes de milho e proteção contra *Pythium* sp. presente no solo pelo tratamento com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.585-590, 1995.

SALA, V. M. R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 124 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.