

RECOBRIMENTO DE SEMENTES COM ÁCIDOS HÚMICOS E  
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

**PATRÍCIA MARLUCI DA CONCEIÇÃO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO - 2007

RECOBRIMENTO DE SEMENTES COM ÁCIDOS HÚMICOS E  
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

**PATRÍCIA MARLUCI DA CONCEIÇÃO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Henrique Duarte Vieira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO – 2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 042/2007

Conceição, Patrícia Marlucci da

Recobrimento de sementes com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas / Patrícia Marlucci da Conceição. – 2007.

110 f. : il.

Orientador: Henrique Duarte Vieira

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2007.

Bibliografia: f. 84 – 95.

1. Recobrimento 2. Milho 3. Bactérias diazotróficas endofíticas 4. Ácidos húmicos 5. Semente. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 633.1521

RECOBRIMENTO DE SEMENTES COM ÁCIDOS HÚMICOS E  
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

PATRÍCIA MARLUCI DA CONCEIÇÃO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovado em 15 de março de 2007

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Lúcia Gracinda da Silva (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) - CEFET-  
Campos

---

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do solo) - UENF

---

Prof. Roberto Ferreira da Silva (Ph.D., Horticultura) – UENF

---

Prof. Henrique Duarte Vieira (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF  
Orientador

Aos meus pais, Benedito e Mirian.

A minha irmã Priscila.

A meu namorado Thiago.

**DEDICO ESTE TRABALHO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo que tem feito por mim.

Aos meus pais, pela vida, pelo amor, dedicação e apoio em mais esta conquista.

A minha irmã Priscila, pela força e amizade.

A meu namorado Thiago pelo amor e companheirismo.

Ao Professor Henrique Duarte Vieira, pela sua orientação, dedicação, incentivo, paciência e amizade.

Aos Professores Roberto Ferreira da Silva e Luciano Canellas por todas as sugestões que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Alexandre e ao colega Leandro, pela contribuição nas análises estatísticas. Ao Professor Fábio Olivares, por me acolher em seu laboratório e pelas sugestões.

Aos amigos do Laboratório de sementes, Antônio Carlos, Graciana, Anna Christina e Gabriela, pela convivência e ajuda em todos os momentos.

Ao Robertinho (LSOL) e aos amigos do LBCT/CBB, Erineudo, Késsia, Adrianinha, Lúcia, Vanessa.

À Silvia e Priscila, pela harmoniosa convivência diária e pela ajuda.

Aos amigos que ganhei durante minha permanência na UENF, Joseane, Robson, Luciléia, Parteli, Dimmy, Silda, Deisy, Marcos Vinícios, Thiago, Jonicélia, Taís, Gustavo, Léa, Sônia.

Aos familiares e amigos de Porto Feliz pelo incentivo.

Aos professores do LFIT, pelos ensinamentos e amizade.

A UENF e CAPES, pela viabilização deste trabalho e pela concessão da bolsa de estudo.

E por fim, agradeço a todos aqueles, que o momento não me permite lembrar, mas que participaram de alguma forma do longo caminho percorrido até a conclusão da presente dissertação.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Importância e uso do recobrimento de sementes .....	3
2.2. A Inoculação de bactérias diazotróficas.....	6
2.3. As bactérias diazotróficas endofíticas.....	7
2.4. Os ácidos húmicos e as bactérias diazotróficas endofíticas .....	9
2.5. Materiais utilizados no recobrimento de sementes .....	11
2.6. Materiais utilizados como cimentantes (adesivos).....	11
2.7. Equipamentos e metodologia de recobrimento.....	12
2.8. Armazenamento de sementes recobertas .....	13
3. TRABALHOS.....	15
QUALIDADE FISIOLÓGICA E RESISTÊNCIA DE SEMENTES DE MILHO RECOBERTAS.....	15
Resumo .....	15
Abstract .....	16
Introdução .....	16
Material e métodos.....	19
Resultados e discussão.....	22
Resumo e conclusões .....	27
Referências bibliográficas .....	28

RECOBRIMENTO DE SEMENTES COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS .....	31
Resumo .....	31
Abstract .....	32
Introdução .....	33
Material e métodos .....	35
Resultados e discussão .....	40
Resumo e conclusões .....	53
Referências bibliográficas .....	54
SEMENTES DE MILHO RECOBERTAS: GERMINAÇÃO, VIGOR E VIABILIDADE DO INÓCULO DURANTE O ARMAZENAMENTO .....	61
Resumo .....	61
Abstract .....	62
Introdução .....	63
Material e métodos .....	65
Resultados e discussão .....	68
Resumo e conclusões .....	77
Referências bibliográficas .....	78
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
APÊNDICES .....	96
APÊNDICE A: Resumo das análises de variância das porcentagens de perda de material de recobrimento e da qualidade fisiológica de sementes de milho recobertas, em função de diferentes concentrações de cimentante .....	97
APÊNDICE B: Resumo das análises realizadas em plântulas oriundas de sementes de milho recobertas com adição de ácidos húmicos e inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas .....	99
APÊNDICE C: Composição dos meios DYG's (modificado), solução salina para diluição e meio de cultura JNFb .....	104
APÊNDICE D: Resumo das análises de variância do teste de germinação (TG), da primeira contagem do TG, do teste frio sem solo e da contagem de bactérias de sementes armazenadas .....	108

## RESUMO

CONCEIÇÃO, Patrícia Marlucci. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; março de 2007; Recobrimento de sementes com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. Orientador: Prof. Henrique Duarte Vieira; Conselheiros: Luciano Pasqualoto Canellas e Roberto Ferreira da Silva.

Neste trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do recobrimento de sementes de milho UENF 506-8 com ácidos húmicos (AH), bactérias diazotróficas endofíticas e uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas na estimulação do crescimento vegetal. Para isto foi avaliada a porcentagem de cimentante a ser utilizada no recobrimento das sementes; a estimulação do crescimento de plantas oriundas de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso em conjunto de bactérias e AH; o período de sobrevivência das células bacterianas no recobrimento e a qualidade fisiológica das sementes recobertas armazenadas. Entre as porcentagens de cimentante avaliadas recomenda-se a utilização de 2% de cimentante para a semeadura manual e para a semeadura mecanizada 4 %. Em Laboratório, a adição de AH, bactéria e o uso em conjunto de bactérias e AH estimularam o crescimento vegetal. No experimento em casa de vegetação, com areia, observou-se que o uso em conjunto de bactérias e AH + AH irrigado estimulou o crescimento vegetal em relação ao controle. Na mistura terra + areia, a inoculação das bactérias de maneira isolada aumentou o crescimento das plantas em relação ao controle. Os resultados mostrados nesse trabalho revelaram que os AH utilizados no recobrimento de sementes têm sua capacidade

de estimulação do crescimento radicular diminuído, comparado com o uso em solução. O recobrimento das sementes não alterou a perda de qualidade fisiológica das sementes em relação às sementes nuas durante o armazenamento. Nos tratamentos onde foi realizada a inoculação de bactérias pelo recobrimento de sementes foi detectado a presença das células bacterianas nas raízes das plântulas oriundas de sementes armazenadas por até 60 dias. A presença dos AH não alterou a sobrevivência das células bacterianas no recobrimento das sementes. A inoculação das bactérias pelo recobrimento de sementes foi eficiente, revelando uma técnica promissora e de baixo custo.

## ABSTRACT

CONCEIÇÃO, Patrícia Marluci. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; march 2007; Covering seeds with humic acid and endophytic diazotrophic bacteria. Advisor: Prof. Henrique Duarte Vieira; Counselors: Luciano Pasqualoto Canellas and Roberto Ferreira da Silva.

This work had for objective to evaluate the effect of the covering seeds of maize UENF 506-8 with humic acid (HA), endophytic diazotrophic bacteria and use in set of AH and endophytic diazotrophic bacteria in the stimulation of the vegetal growth. For this cement percentage was evaluated to be used in the covering seeds; the stimulation of the growth of plants originating from of seeds covered with bacteria, AH and the use in set of bacteria and HA; the period of survival of the bacterial cells in the covering and the physiologic quality of the covered seeds stored. Among the percentages of appraised cement the use of 2% of cement is recommended for the manual sowing and for the automated sowing 4%. In Laboratory, the addition of HA, bacteria and the use in set of bacteria and HA stimulated the vegetable growth. In the experiment in greenhouse, with sand, it was observed that the use in set of bacteria and HA + HA irrigated stimulated the vegetal growth in relation to the control. In the mixture land + sand, the inoculation of the bacteria in isolated way increased the growth of the plants in relation to the control. The results shown in this work show that the HA used in the covering seeds have its capacity of stimulation of the growth to radicular diminished, comparing with the use in solution. The covering seeds did not modify the loss of

physiological quality of the seeds in relation to the seeds not covered during the storage. In the treatments where the inoculation of bacteria was accomplished by the covering seeds the presence of the bacterial cells was detected in the roots of the plants originating from of seeds stored for up to 60 days. The presence of HA didn't alter the survival of the bacterial cells in the covering seeds. The inoculation of the bacteria for the covering seeds was efficient, revealing a promising technique and low cost.

## 1. INTRODUÇÃO

O recobrimento de sementes é a aplicação de materiais inertes, envolvendo a cobertura natural da semente e pode ser usado como veículo para adição de outras substâncias como nutrientes, pesticidas, corantes etc.

Essa técnica tem sido muito utilizada em sementes de hortaliças, ornamentais e forrageiras que apresentam sementes de formas irregulares e pequenas, dificultando o manuseio e a semeadura direta no campo.

O recobrimento de sementes também pode ser utilizado para inoculação de bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio). O material utilizado para o recobrimento das sementes deve proporcionar um micro-ambiente favorável à sobrevivência e multiplicação das bactérias e não deve prejudicar a qualidade fisiológica das sementes.

Para a inoculação do rizóbio em leguminosas até o momento da simbiose, o material de inoculação que tem mostrado ser o mais apropriado é a turfa. Para a proteção do inoculante as sementes são recobertas com materiais como fosfatos de rocha e carbonato de cálcio (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994).

Em poáceas os estudos estão direcionados em selecionar um veículo de inoculação das bactérias diazotróficas endofíticas para ser distribuído aos agricultores.

A eficiência da produção de inoculantes para poáceas, assim como em leguminosas, depende, entre outros fatores, da manutenção do número mínimo

de células viáveis da bactéria no inoculante desde a sua fabricação até o uso pelo agricultor (Ferreira et al., 2003).

As bactérias diazotróficas endofíticas apresentam grande potencial para utilização na agricultura, dado à habilidade de colonizar o interior das plantas e de se localizar em nichos protegidos do oxigênio, mantendo assim, a atividade da enzima nitrogenase no nível máximo (Kennedy et al., 1997).

Além do inoculante, ácidos húmicos (AH) também podem ser adicionados ao material de recobrimento. Os AH podem promover aumento do estabelecimento do inóculo bacteriano no interior da planta. Segundo Marques Júnior (2006), a maioria dos trabalhos envolvendo a ação fisiológica direta dos AH relata fenômenos envolvendo absorção de íons e aumento da fasciculação e da área do sistema radicular das plantas. O aumento de raízes laterais e sítios mitóticos aumentam os pontos de infecção para as bactérias.

Marques Júnior (2006) afirma que há grande potencial para o uso em conjunto de ácidos húmicos (AH) e bactérias diazotróficas endofíticas na estimulação do crescimento vegetal.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do recobrimento de sementes de milho UENF 506-8 com ácidos húmicos (AH), bactérias diazotróficas endofíticas e uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas na estimulação do crescimento vegetal. Para isso, analisou-se a concentração de cimentante a ser utilizada no recobrimento das sementes; a estimulação do crescimento de plantas oriundas de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso em conjunto de bactérias e AH; a sobrevivência das bactérias no recobrimento e a qualidade fisiológica das sementes armazenadas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Importância e uso do recobrimento de sementes**

Nos trabalhos científicos, encontram-se os termos peletização, recobrimento, revestimento, todos se referindo à aplicação de materiais sólidos para envolver a cobertura natural das sementes.

Hathcock et al. (1984) afirmaram que o recobrimento de sementes se refere à disposição de materiais sobre a cobertura protetora natural da semente com o propósito de melhorar a semeadura, desenvolvimento e/ou a sobrevivência das espécies cultivadas. Silva e Nakagawa (1998c) afirmaram que peletização é a aplicação de um revestimento rígido e seco que visa modificar, individualmente, o formato e o tamanho das sementes.

Giménez-Sampaio e Sampaio (1994) definiram revestimento como a aplicação de materiais sólidos cobrindo o envoltório natural das sementes para individualizá-las. Esse tratamento apenas modifica o peso e a forma original da semente. Na peletização, as sementes são envolvidas por materiais sólidos, tornando-se esféricas ou elípticas, com uma ou mais sementes por unidade. No recobrimento, além dos materiais inertes, pode haver adição de outras substâncias como nutrientes, pesticidas, corantes etc. De forma geral, esses autores recomendam a utilização do termo recobrimento para designar sementes peletizadas e recobertas. Neste trabalho utilizar-se-á o termo geral recobrimento de sementes.

A idéia de recobrir sementes não é recente. A primeira patente com recobrimento de sementes foi emitida em 1868, mas a aplicação comercial não obteve interesse real até 1940. A partir dos bons resultados iniciais, outras companhias interessaram-se pelo tema, e em 1946, formalizou-se a primeira patente mundial pela empresa CERES, com sementes de beterraba (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994).

Com a busca permanente de incrementos de produtividade e diminuição dos custos de produção por parte do produtor, o recobrimento de sementes adquire grande importância, pois é uma técnica com potencial para resolver questões tais como a proteção das sementes contra ataque exteriores, o fornecimento de nutrientes, oxigênio, reguladores de crescimento e/ou a aplicação localizada de herbicidas, entre outros; mas, sobretudo, permite uma semeadura de precisão (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994).

A semeadura de precisão é a colocação de uma ou mais sementes no solo, numa profundidade e espaçamento determinados, com cobertura uniforme (Coraspe et al., 1993). Esta operação traz vantagens inegáveis, como a redução ou eliminação do desbaste e economia de sementes. Tudo isto, leva à diminuição de custos de produção, incremento do rendimento e qualidade da colheita.

As modificações do tamanho e da forma das sementes, pelo recobrimento, tornam-nas mais visíveis quando semeadas e estas podem ser manipuladas mais facilmente (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994). Por exemplo, sementes de cenoura são muito pequenas e apresentam cor escura, dificultando a identificação no solo e a semeadura direta. Costa et al. (2001) recobriram estas sementes, visando alterar o tamanho e a cor, e observaram maior contraste com o solo e facilidade de semeadura.

Resende et al. (2005) e Kanashiro et al. (1979) recobriram sementes pequenas de espécies florestais que também apresentaram facilidade de semeadura.

Mendonça (2003) recobriu sementes de milho doce e concluiu que esta técnica foi capaz de uniformizar a forma e tamanho das sementes.

Segundo Giménez-Sampaio e Sampaio (1994), o recobrimento pode ser importante para a semeadura aérea, pois sementes recobertas possuem maior capacidade de penetrar no solo, favorecendo seu estabelecimento. Este princípio

é utilizado para sementes de arroz, quando é realizada semeadura aérea em zonas previamente inundadas.

Visando melhorar a eficiência da semeadura aérea em sementes de sorgo e aumentar a quantidade de nutrientes próximos às plântulas, Magalhães et al. (1994) recobriram estas sementes com calcário adicionando diferentes adubos e observaram que, de maneira geral, a qualidade e o vigor das sementes de sorgo foram maiores. Os autores constataram que o recobrimento aumentou o peso das sementes, possibilitando a semeadura aérea.

Pradella et al. (1989) estudaram a viabilidade do recobrimento em gel hidrofílico à base de alginato de cálcio em sementes florestais nativas da Serra do Mar, as quais apresentavam peso inferior a 1 mg dificultando a semeadura aérea. O recobrimento assegurou condições propícias para germinação e posterior desenvolvimento das plântulas no solo.

Outra finalidade do recobrimento de sementes é a aplicação de protetores químicos. Através desta técnica, podem-se aplicar diversos produtos fitossanitários incompatíveis nas sementes, pois estes seriam aplicados em camadas. Além disso, outra vantagem é a utilização de menor quantidade de produto para alcançar o efeito desejado (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994).

Pires et al. (2004) recobriram sementes de feijão com polímeros vinílicos visando fixar fungicidas. Os autores observaram que o recobrimento com estes polímeros afetou a eficiência do controle dos patógenos, positiva ou negativamente, dependendo do fungicida utilizado e de sua forma de aplicação.

Sementes de pimentão foram tratadas por Oliveira et al. (2003b), com fungicida e depois de secas, parte das sementes foi recoberta com uma mistura de areia + microcelulose e outra com calcário + microcelulose. Os autores concluíram que a natureza do material de recobrimento não influenciou a qualidade das sementes e que o recobrimento foi benéfico quando as sementes foram armazenadas em embalagens impermeáveis.

O recobrimento, além destas finalidades citadas, pode ser uma forma de inoculação de microrganismos benéficos às sementes.

## 2.2. A Inoculação de bactérias diazotróficas

O nitrogênio está presente em diversas formas na biosfera. A atmosfera contém uma vasta quantidade (cerca de 78% por volume) de nitrogênio molecular ( $N_2$ ). Porém, esse grande reservatório de nitrogênio não está diretamente disponível para os organismos vivos. A obtenção de nitrogênio da atmosfera requer a quebra de uma ligação tripla covalente de excepcional estabilidade entre os dois átomos de nitrogênio ( $N \equiv N$ ) para produzir amônia ( $NH_3$ ) ou nitrato ( $NO_3$ ). Tais reações, conhecidas como fixação do nitrogênio, podem ser obtidas por processo industrial e por processo natural (Taiz e Zeiger, 2004).

A energia necessária para redução do  $N_2$  à amônia é muito alta, encarecendo extremamente esse processo quando feito industrialmente. A formação de amônia ( $NH_3$ ) a partir do  $N_2$  ocorre somente nas temperaturas entre 300 e 500 °C e pressão acima de 300 atmosferas (Coelho, 2001).

O processo natural de fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo de importância ecológica e econômica, por diminuir o uso e o impacto causado pelos fertilizantes nitrogenados.

O aumento do custo dos adubos nitrogenados e a preocupação cada vez maior, no exterior e no Brasil, com possíveis efeitos negativos do excesso de nitrato nos mananciais são fatores que devem ser levados em consideração para o incentivo do estudo do processo natural de fixação biológica (Cantarella e Duarte, 2004). Esse processo é realizado por microrganismos chamados de diazotróficos (bactérias e cianobactérias fixadoras de nitrogênio).

Cultivares adaptados a ambientes pobres em nitrogênio e capazes de se associar às bactérias diazotróficas podem representar uma alternativa ecologicamente sustentável e economicamente viável para a produção agrícola com baixa utilização de insumos.

O uso de elevados níveis de nitrogênio durante o desenvolvimento dos cultivares pode levar à seleção de genótipos que representam consumo de luxo de N ou requeiram elevadas doses deste nutriente para expressarem seu potencial produtivo (Carlone e Russel, 1987). Entretanto, os baixos níveis de N podem contribuir naturalmente para a seleção de genótipos eficientes na fixação biológica do nitrogênio (Boddey et al., 1995) diminuindo a necessidade da fertilização nitrogenada.

Em um trabalho recente, Roesch et al. (2005) avaliaram 32 cultivares de milho, visando identificar a eficiência na associação das plantas com bactérias diazotróficas. Os resultados mostraram que entre os cultivares avaliados, dois apresentaram elevada população de bactérias diazotróficas.

Para que as bactérias diazotróficas estabeleçam-se nas raízes das plantas, é necessário que essas estirpes tenham uma população no solo suficientemente grande para permitir a fixação nas raízes. Quando a população microbiana no solo não é grande ou as estirpes presentes não são eficientes, torna-se necessário recorrer a métodos artificiais de introdução das estirpes selecionadas. Neste caso, o recobrimento de sementes pode ser umas das técnicas utilizadas para a inoculação das bactérias.

Segundo Binneck et al. (1999), condições ambientais desfavoráveis no solo, no momento da semeadura, tais como pH baixo, raios solares diretos e fertilizantes afetam a sobrevivência e a capacidade de multiplicação das bactérias fixadoras de nitrogênio. Recomenda-se recobrir as sementes com material que proporcione um micro-ambiente favorável à sobrevivência e multiplicação destas.

Norris et al. (1970) testaram a inoculação de quatro estirpes de rizóbio (bactéria de vida livre) em quatro espécies de leguminosas. As sementes foram inoculadas com turfa e recobertas com calcário, favorecendo a nodulação sem necessidade de calagem do solo. A técnica de recobrimento mostrou-se vantajosa para a nodulação de duas estirpes de rizóbio.

Binneck et al. (1999) inocularam sementes de trevo-branco com *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* em turfa e as recobriram com calcário. Foi adicionado ao recobrimento molibdênio, micronutriente que participa no processo biológico de fixação simbiótica e no metabolismo do nitrogênio. A inoculação das bactérias e a aplicação de molibdênio através do recobrimento das sementes aumentaram o número de raízes, a quantidade de nitrogênio e massa seca da parte aérea das plantas.

### **2.3. As bactérias diazotróficas endofíticas**

As bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam plantas da família Poaceae podem ser agrupadas em três categorias: organismos de rizosfera, que inclui todas as espécies que colonizam a superfície radicular, tais como,

*Azotobacter paspali* e *Beijerinckia spp.*; endofíticos facultativos, todas as bactérias diazotróficas que podem colonizar a superfície e interior das raízes, representadas basicamente pelas espécies de *Azospirillum*, exceto *A. halopraeferens*; e endofíticos obrigatórios, constituído, principalmente, pelas espécies isoladas mais recentemente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp.* e *Azoarcus*, que são capazes de colonizar o interior das raízes e tecidos aéreos das plantas (Baldani et al., 1997).

Uma das primeiras associações tipicamente rizosféricas descobertas entre poáceas e bactérias foi entre plantas de cana-de-açúcar crescendo em solos tropicais com *Beijerinckia fluminensis*. Entretanto, após a descoberta do gênero *Azospirillum*, houve um aumento dos estudos destas interações (Baldani et al., 1997).

A primeira espécie endófitas a ser identificada foi o *Herbaspirillum seropedicae* e, posteriormente, outros membros do gênero foram incluídos, como o *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum frisingense*, e a última descrição apresentou uma espécie isolada de nódulos de feijão coabitando com o rizóbio, o *Herbaspirillum lusitanum* (Radwan et al., 2004).

O estabelecimento endofítico, comparado ao ambiente rizosférico, tem sido considerado um evento importante para que as bactérias possam influenciar mais eficientemente no crescimento da planta, visto que, no interior do vegetal, a competição microbiana é menor, este nicho é menos sujeito a flutuação ambiental e a interface de troca de metabólitos é mais direta quando comparada com a rizosfera (Perin et al., 2003).

Outros efeitos das bactérias diazotróficas endofíticas sobre a planta hospedeira, além da contribuição da FBN, estão sendo estudados. Por exemplo, as bactérias diazotróficas endofíticas podem desempenhar um papel fisiológico importante no desenvolvimento da planta hospedeira, como o biocontrole de fitopatógenos (Oliveira et al., 2003a), a supressão da doença por indução de resistência localizada e/ou sistêmica (Duijff et al., 1997, citado por Perin et al., 2003) e promoção do crescimento vegetal por mecanismos diferentes da FBN (Mirza et al., 2001).

Olivares et al. (2002), avaliando plantas de cana-de-açúcar, variedade RB 72454, inoculadas com *H. seropedicae* estirpe HRC54 e *G. diazotrophicus* estirpe

PAL5, observaram que ambas as estirpes de bactérias estimularam a atividade das bombas de  $H^+$ .

A produção de hormônios por essas bactérias é um dos fatores responsáveis pelo efeito estimulatório na atividade das bombas de  $H^+$ . Bastián et al. (1998) detectaram a presença de AIA e giberelinas A1 e A3 em culturas de *Herbaspirillum seropedicae* e *Acetobacter diazotrophicus* e Radwan et al. (2002) constataram a produção de indóis por estirpes de *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em plântulas de milho e arroz inoculadas.

O gradiente eletroquímico gerado pelas bombas de  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática está diretamente envolvido com dois mecanismos fundamentais do desenvolvimento vegetal: (i) a energização de sistemas secundários de translocação de íons fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes e (ii) o aumento da plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e divisão da célula vegetal (Façanha et al., 2002). Esse último mecanismo está relacionado com a teoria do crescimento ácido que postula que um aumento da extrusão de prótons mediado pela  $H^+$ -ATPase promove a acidificação do apoplasto, que por sua vez ativa enzimas específicas que atuam sobre a parede celular, aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento da célula (Rayle e Cleland, 1992).

As respostas à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas foram avaliadas por Canuto et al. (2003). Os autores inocularam 44 estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar que foram individualizadas na fase de enraizamento e transferidas para frascos no qual foram inoculadas; das estirpes testadas, três promoveram aumento significativo da massa seca dos colmos.

Guimarães et al. (2003) e Ferreira et al. (2003) inocularam sementes de arroz com as bactérias diazotróficas endofíticas da espécie *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 BR 11417 utilizando turfa e observaram aumento na produção de grãos.

#### **2.4. Os ácidos húmicos e as bactérias diazotróficas endofíticas**

A matéria orgânica do solo, do ponto de vista estritamente teórico, pode ser dividida em dois grandes compartimentos: um, composto pela fração não-

humificada, representada pelos restos vegetais e animais pouco decompostos e pelos compostos orgânicos com categoria bioquímica definida (proteínas, açúcares, ceras, graxas, resinas), e outro compartimento formado pelas substâncias humificadas (SH) (Canellas et al., 2001).

A matéria orgânica humificada do solo é composta por diferentes frações, de acordo com sua solubilidade. De modo geral, aceita-se a distribuição das frações humificadas em três categorias: as huminas (H), que representam a matéria orgânica intimamente ligada à fração mineral do solo e por isso insolúvel; os ácidos fúlvicos (AF), que apresentam grande quantidade de grupamentos funcionais oxigenados e são solúveis tanto em meio ácido como básico, e os ácidos húmicos (AH), insolúveis em meio fortemente ácido. Os AH representam a fração reativa mais estável da matéria orgânica humificada (Szabó, 2004; Canellas et al., 2001).

As SH além de fornecer nutrientes para as plantas com a mineralização, podem estimular diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Os efeitos das SH sobre o desenvolvimento vegetal são dependentes da fonte de obtenção, das doses utilizadas e da espécie das plantas estudadas (Vaughan e Malcolm, 1985, citado por Zandonadi, 2006).

Segundo Façanha et al. (2002) e Canelas et al. (2002), os AH apresentam grupamentos auxínicos em sua estrutura que ativam as bombas de  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática. Esse fato promove a acidificação do apoplasto e o conseqüente aumento da plasticidade da parede celular, resultando no incremento da área e comprimento radicular.

Avaliando a ação dos ácidos húmicos, Arancon et al. (2003) observaram aumento na altura, área foliar, peso da matéria seca da parte aérea e raiz em plantas de pimenta, tomate e calêndula e aumento no número de frutos em plantas de morangos.

As substâncias húmicas (SH) podem atuar no aumento da população de bactérias diazotróficas endofíticas, atuando como condicionador físico-químico, bem como promovendo aumento do estabelecimento do inóculo bacteriano no interior da planta. Isso pode ser hipoteticamente explicado como parte dos efeitos das SH sobre o aumento no número de raízes laterais, as quais constituem no sítio majoritário de infecção da planta hospedeira por bactérias endofíticas (Marques Júnior, 2006).

## **2.5. Materiais utilizados no recobrimento de sementes**

No recobrimento de sementes utiliza-se basicamente um material seco, inerte, de granulometria fina e um cimentante, que deve ser um adesivo não fitotóxico e solúvel em água (Silva e Nakagawa, 1998a).

À princípio, o material de enchimento deve constituir-se de partículas grossas e uniformes, visando formar poros grandes. Ocorre, entretanto, grande limitação na granulometria do material de enchimento, porque a adesão de partículas grandes necessita de maior quantidade de adesivo, causando o recobrimento de mais de uma semente, o que é indesejável (Silva e Nakagawa, 1998c).

Costa et al. (2001) compararam o recobrimento de sementes de cenoura confeccionado com cal, calcário e gesso e observaram que os três materiais são indicados para tornar as sementes mais visíveis, em contraste com o solo.

Avaliando o recobrimento em sementes de milho doce, Mendonça (2003) comparou os seguintes materiais de enchimento: calcário, caulim, carvão vegetal ativado, areia, vermiculita, fubá de milho, farinha de trigo, polvilho de mandioca, amido de milho, celite e terra diatomáceas, observando que o carvão vegetal possibilitou o maior crescimento e desenvolvimento das plântulas.

Outros materiais podem ser utilizados como material de recobrimento, como polímeros vinílicos (Pires et al., 2004), gel hidrofílico (Pradella, 1989), argilas, serragem, cascas, farinha de ossos, farinha de sangue (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994). O tipo de material utilizado irá depender dos objetivos do recobrimento.

## **2.6. Materiais utilizados como cimentantes (adesivos)**

A integridade física do recobrimento é uma característica importante. Após a secagem, a cobertura não deve desmanchar ou quebrar durante o processo de classificação, transporte, manuseio e semeadura mecanizada (Silva e Nakagawa, 1998a).

Para evitar a desintegração da camada de recobrimento são utilizados materiais cimentantes (adesivos) que devem ser solúveis em água, ter afinidade com os demais ingredientes e não causar danos às sementes (Mendonça, 2003).

A afinidade entre o cimentante e os demais ingredientes, ou o equivalente ao poder de fixação do produto, é fator importante, no sentido de se utilizar a menor proporção de cimentante no recobrimento (Silva e Nakagawa, 1998a).

Acredita-se que a utilização de quantidades menores de adesivo na formação das camadas de recobrimento seja favorável, visto que esses materiais são viscosos. Assim, na hidratação da semente após a semeadura esses produtos não dificultariam a absorção da água (Mendonça, 2003; Silva e Nakagawa, 1998a).

A definição da proporção de cimentante implica na necessidade de testes para conseguir um material com resistência e com o mínimo de cimentante.

Giménez-Sampaio e Sampaio (1994) relatam o emprego de produtos cimentantes simples como mel, leite em pó, azeite, amido, açúcares e gelatinas, até outros mais elaborados como a goma arábica, etil, metil celulose ou caseína, acetato de polivinil, álcool polivinílico, óxidos de polietileno, polieletrólitos insolúveis, poliuretanos e resinas plásticas.

Silva e Nakagawa (1998a) avaliaram colas à base de acetato de polivinila (PVA) das marcas: cascorez, grudi extra, cascorez extra, perapret-va, cascofix e tudo cola; a cola cascorez extra apresentou os melhores resultados, não prejudicando o crescimento das plântulas e mostrou curto tempo de reidratação.

Mendonça (2003) avaliou os adesivos cola cascorez extra, goma arábica, produtos à base de amido como polvilho de mandioca, farinha de trigo e amido de milho, não obtendo bons resultados com os adesivos à base de amido, devido à grande atração desses materiais por microrganismos.

## **2.7. Equipamentos e metodologia de recobrimento**

As sementes recobertas são obtidas a nível comercial pela agitação das mesmas no interior de um tambor rotativo, onde se adiciona alternadamente um cimentante (adesivo) e o material inerte. O adesivo pode incorporar-se mediante pulverização, nebulização ou atomização, enquanto o material inerte costuma ser pulverizado (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994).

Esse tambor rotativo pode ser uma drageadora ou uma betoneira. Mendonça (2003) utilizou uma drageadora; para a aplicação do adesivo, que estava dissolvido em água, utilizou uma pistola de pintura acionada por ar comprimido; o material inerte foi peneirado sobre as sementes dentro da drageadora em movimento.

Norris et al. (1970) recobriram as sementes dentro de um béquer, para agitação das sementes utilizou um bastão de vidro. As sementes foram tratadas, primeiramente, com solução de adesivo, em seguida, adicionou-se o material de recobrimento.

## **2.8. Armazenamento de sementes recobertas**

Apesar do acentuado incremento no uso de sementes recobertas verificado nos últimos anos, são poucas as informações que têm sido publicadas sobre a resposta destas sementes durante o período de armazenamento (Mendonça, 2003; Oliveira et al., 2003b). Entretanto, acredita-se que os princípios fundamentais para a correta conservação de sementes recobertas são os mesmos reconhecidos para as sementes nuas (Duffus e Slaughter, 1980, citado por Costa et al., 2001).

Para se conseguir uma boa conservação da qualidade das sementes, é necessário manter ao mínimo a atividade metabólica das sementes. Isso é possível pelo armazenamento das mesmas à baixa temperatura e umidade relativa do ar, com o objetivo de minimizar a velocidade de deterioração e controlar a ação de microrganismos próprios do armazenamento (Gimenez-Sampaio e Sampaio, 1994).

Estudando a resposta de sementes recobertas ao armazenamento, Costa et al. (2001), trabalhando com sementes de cenoura recobertas com cal, calcário e gesso, observaram que as sementes podem ser recobertas com quaisquer dos recobrimentos e armazenadas por até nove meses, sem perda de seu vigor.

Oliveira et al. (2003b), analisando os resultados do teste de germinação e vigor para sementes de pimentão recobertas e armazenadas em embalagem impermeável, observaram que a redução da qualidade após 20 meses de armazenamento foi menor em relação às sementes armazenadas em embalagem permeável.

Segundo Mendonça (2003), nos estudos com armazenamento, quando em condições ideais, não há diferenças na manutenção da viabilidade entre sementes recobertas e nuas, mas em condições inadequadas as sementes recobertas perdem mais rapidamente a viabilidade, o que implica em cuidados mais rigorosos no período de armazenamento e manuseio de sementes recobertas.

### **3. TRABALHOS**

#### **QUALIDADE FISIOLÓGICA E RESISTÊNCIA DE SEMENTES DE MILHO RECOBERTAS**

##### **RESUMO**

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a qualidade fisiológica de sementes de milho UENF 506-8 recobertas e a resistência do recobrimento utilizando diferentes porcentagens de cimentante. Utilizou-se no recobrimento das sementes uma mistura de calcário e meio de cultura. Como cimentante foi utilizada cola a base de acetato de polivinila (PVA). O recobrimento das sementes de milho foi realizado com uma mistura de 70% (p/p) de calcário, 10% (p/p) de meio de cultura semi-sólido JNFb e 20% (p/p) de água destilada. Foram adicionadas a essa mistura diferentes porcentagens de cimentante: 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 % (p/p). Para avaliação da resistência do recobrimento foi simulado o transporte e a semeadura manual e a semeadura mecânica das sementes recobertas. A avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi realizada em sementes nuas (controle) e sementes recobertas com as porcentagens de cimentante: 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 %. O aumento da porcentagem de cimentante de 2 para 3% causou uma pequena redução não significativa na velocidade da

germinação, na velocidade de emergência e na emergência, mas não afetou o número final de plântulas normais no teste de germinação e teste frio. Para a semeadura manual recomenda-se a utilização de 2% de cimentante e para a semeadura mecanizada 4 %.

### **ABSTRACT**

This work was developed with the objective of evaluating the physiologic quality of corn seeds UENF 506-8 covered and the resistance of the covering using different percentages of cement. It was used in the covering of the seeds a mixture of lime and middle of culture. As cement was used polivinil acetate glue (PVA). The covering of the corn seeds was executed with a mixture of 70% (w/w) of lime, 10% (w/w) of semi-solid JNFb and 20% (w/w) of water. In the mixture different percentages were added: 0,5; 1; 2; 3; 4 and 5% (w/w). Evaluating the resistance of the covering was simulated the transport and the manual sowing and the mechanical sowing of covered seeds. The evaluation of the physiologic quality of the seeds was accomplished in seeds not covered and covered seeds with the percentages of cement: 0,5; 1; 2; 3; 4 and 5%. The increase of the percentage of cement of 2 for 3% caused a small reduction no significant in the speed of the germination, emergency of speed and emergency, but it didn't affect the final number of normal plants in the germination test and cold test. For the manual sowing the use of 2% of cement is recommended and for the automated sowing 4%.

### **INTRODUÇÃO**

A semente não mais representa somente um meio de propagação de uma nova cultura, mas carrega também uma nova forma de gerenciamento da tecnologia agrícola. A agregação de valor às sementes, utilizando métodos e

tecnologias de produção como o recobrimento de sementes, é a mais nova exigência de um mercado cada vez mais competitivo (Medeiros et al., 2004).

Hathcock et al. (1984) afirmaram que o recobrimento de sementes se refere à disposição de materiais sobre a cobertura protetora natural da semente, com o propósito de melhorar a semeadura e/ou o desenvolvimento das espécies cultivadas.

Segundo Silva e Nakagawa (1998c) esse tratamento tem diversas vantagens nos processos de semeadura manual ou mecânica, na aplicação de pequenas quantidades de nutrientes, reguladores de crescimento, inoculantes e também como veículo para aplicação de inseticidas, fungicidas e repelentes de pássaros.

O recobrimento de sementes pode viabilizar a inoculação de inúmeros microrganismos que têm a capacidade de beneficiar a implantação e desenvolvimento dos cultivos. Para a inoculação do rizóbio até o momento da simbiose, o material de inoculação que tem demonstrado ser o mais apropriado é a turfa. Para a proteção do inoculante as sementes são recobertas com materiais como fosfatos de rocha e carbonato de cálcio (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994). Meios de cultura líquidos ou semi-sólidos também podem ser utilizados como inoculantes de bactérias, onde o recobrimento será utilizado para aderir o meio de cultura à semente, além de contribuir para um micro-ambiente favorável à sobrevivência da bactéria.

No recobrimento de sementes utiliza-se basicamente um material de enchimento seco, de granulometria fina, e um cimentante que deve ser um adesivo não fitotóxico e solúvel em água (Silva e Nakagawa, 1998a).

A integridade física do recobrimento é uma característica importante. Após a secagem, a cobertura não deve desmanchar ou quebrar durante o processo de transporte, manuseio, semeadura manual ou mecanizada (Silva e Nakagawa, 1998c). Para evitar a desintegração da camada do recobrimento são utilizados materiais cimentantes (adesivos) que devem ter afinidades com os demais ingredientes (Mendonça, 2003).

A afinidade entre o cimentante e os demais ingredientes, ou o equivalente ao poder de fixação do produto, é fator importante, no sentido de se utilizar a menor proporção de cimentante no recobrimento (Silva e Nakagawa, 1998c).

A definição da proporção de cimentante implica no dilema entre a necessidade de se ter resistência física e a limitação do uso de cimentantes, sendo então necessário avaliar a resistência do recobrimento, para que se possa utilizar a menor porcentagem possível de cimentantes, sem afetar a qualidade final do produto (Silva e Nakagawa, 1998b).

Embora a técnica de recobrimento tenha sido desenvolvida há vários anos, as informações referentes à composição dos materiais empregados e à confecção do recobrimento são pouco difundidas, uma vez que esta técnica permanece inacessível junto às empresas de sementes e às companhias processadoras de recobrimento (Silva et al., 2002).

Apesar das vantagens do recobrimento, alguns autores afirmam que este processo pode afetar a qualidade fisiológica das sementes. Neste sentido, Franzin et al. (2004) verificaram que a germinação de sementes de alface foi inibida após o recobrimento, provavelmente, pela dificuldade de absorção de água e oxigênio imposta pelo material de recobrimento.

No entanto, Silva e Nakagawa (1998c) afirmam que o retardamento da germinação da semente recoberta pode ser de até 20 dias ou mais, mas, geralmente, são obtidas taxas de germinação final semelhantes à germinação de sementes nuas. Os autores afirmam que vencida a barreira do material de recobrimento, que geralmente é inferior a 2 mm de espessura, a plântula passa a não sofrer qualquer efeito do recobrimento, resultando em índices normais de produtividade e qualidade.

Segundo Silva e Nakagawa (1998a), a superação do obstáculo imposto pelo recobrimento está intimamente relacionada ao vigor da semente e por isso, pequenas diferenças no vigor contribuem para a desuniformidade da população inicial de plantas. Contudo, vencida a barreira, as plântulas se igualam na velocidade de crescimento, formando mudas uniformes em massa fresca e seca, tanto em condições de laboratório quanto em viveiros de mudas.

Binneck et al. (1999), estudando o efeito do recobrimento das sementes sobre a germinação e a emergência de sementes de trevo-branco, concluíram que com o uso de sementes recobertas pode-se conseguir populações com altas taxas de germinação e emergência de plântulas. Nesta mesma linha de pesquisa, Kanashiro et al. (1978), trabalhando com sementes de diferentes espécies de

eucalipto, observaram que o recobrimento não afetou a germinação e o crescimento das plantas.

No presente trabalho objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica de sementes de milho UENF 506-8 recobertas e a resistência do recobrimento utilizando diferentes porcentagens de cimentante. Ao material de recobrimento foi adicionado meio de cultura JNFb, visando posteriormente utilizar essa técnica como meio de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Setor de Produção e Tecnologia de Sementes do Laboratório de Fitotecnia e em casa de vegetação, ambos pertencentes ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes – RJ. Foram utilizadas sementes de milho híbrido UENF 506-8.

O material de recobrimento utilizado foi o calcário dolomítico (granulometria fina) com adição de meio de cultura JNFb. Como cimentante foi utilizada cola a base de acetato de polivinila (PVA) dissolvida em água destilada. O recobrimento das sementes de milho foi realizado com a mistura de 70% (p/p) de calcário, 10% (p/p) de meio de cultura semi-sólido JNFb (Baldani et al., 1992) e 20% (p/p) de água destilada. Essa mistura foi realizada dentro de um béquer. Foram adicionadas a essa mistura diferentes porcentagens de cimentante: 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 % (p/p).

As sementes foram recobertas uma a uma imergindo as sementes no béquer com o material do recobrimento com auxílio de uma pinça e, em seguida, postas a secar ao ar livre, durante um período de 24 horas, sobre um recipiente polvilhado com calcário a fim de evitar que as sementes ficassem aderidas ao fundo do recipiente. O aspecto visual das sementes recobertas pode ser observado na Figura 1.



Figura 1. Aspecto visual das sementes de milho (UENF 506-8) nuas (esquerda) e sementes recobertas (direita) secas por um período de 24 horas.

Para avaliação da resistência do recobrimento quatro repetições de 30 sementes recobertas de cada tratamento foram pesadas e armazenadas em sacos de papel multifoliado. Esses sacos foram colocados dentro de uma sacola plástica e, simulando o transporte das sementes, os sacos de papel foram agitados visando a colisão entre eles. Após isso, os sacos de papel foram retirados da sacola e lançados, individualmente, de uma altura de 1 metro, simulando os danos de uma sementeira manual ao recobrimento. Para a determinação do material de recobrimento perdido as sementes foram pesadas novamente.

Avaliando a resistência do recobrimento à sementeira mecânica, quatro repetições de 30 sementes recobertas de cada tratamento foram pesadas e colocadas em uma sementeira de plantio direto, simulando uma sementeira mecanizada. As sementes, após passarem pelo disco e o duto da sementeira, foram coletadas e pesadas para avaliação da porcentagem de material de recobrimento perdido.

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi realizada com sementes nuas (controle) e sementes recobertas com as porcentagens de cimentante: 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 % pelos testes de germinação (TG), primeira contagem do TG, teste frio sem solo, emergência de plantas em casa de vegetação e índice de velocidade de emergência (IVE).

O teste de germinação (TG) foi realizado de acordo com as recomendações contidas nas Regras para Análises de Sementes (Brasil, 1992),

com modificações, sendo utilizado quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento.

A primeira contagem do TG foi realizada conforme metodologia prescrita para o TG, sendo o resultado expresso pela porcentagem das plântulas normais avaliadas no quarto dia após o início do teste.

Para execução do teste de frio sem solo, quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento foram distribuídas em papel germiteste umedecido com uma quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Após a semeadura os rolos foram colocados no interior de sacos plásticos e estes foram mantidos em incubadora BOD regulada a 10 °C, durante sete dias. Após esse período, os rolos no interior dos sacos plásticos foram transferidos para um germinador regulado à temperatura alternada de 20-30 °C, onde permaneceram por mais sete dias. A avaliação da germinação foi realizada de acordo com as recomendações contidas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Para a avaliação da emergência de plantas em casa de vegetação foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes. Os diferentes tratamentos foram semeados em vasos plásticos de cinco litros com areia de textura média. Estes foram colocados em casa de vegetação e 15 dias após a semeadura foi realizada a avaliação do número de plântulas normais emergidas.

O IVE foi conduzido juntamente com a avaliação da emergência de plantas em casa de vegetação, contabilizando-se diariamente as plântulas emergidas a partir das primeiras plântulas até o décimo quinto dia após a semeadura. Os índices foram calculados de acordo com a fórmula de Maguire (1962).

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (F a 5% de probabilidade). Os tratamentos (quantitativos) da avaliação de resistência foram avaliados via análise de regressão polinomial. Os resultados das avaliações da qualidade fisiológica das sementes foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando a resistência do recobrimento através da simulação do transporte e plantio manual das sementes (Figura 2), observa-se que as porcentagens 0,5 e 1% de cimentante mostraram perdas muito superiores às porcentagens 2, 3, 4 e 5%.

As porcentagens 2, 3, 4 e 5% de cimentante foram estatisticamente iguais, entretanto a porcentagem de 2% seria a porcentagem recomendada. A utilização da menor porcentagem de cimentante, desde que não comprometa a resistência do recobrimento, é mais vantajosa economicamente, além disso, quanto menor a porcentagem de cimentante menor a dificuldade de absorção de água e oxigênio.

Utilizando menor quantidade de cimentante se tem, ao reidratar as sementes recobertas após a semeadura, uma solução com viscosidade baixa na camada do recobrimento, o que facilita a drenagem da água retida nos poros, favorecendo assim, a sua desobstrução e, conseqüentemente, a troca gasosa (Silva e Nakagawa, 1998c). Isso ocorre porque os cimentantes são, geralmente, produtos espessos e a viscosidade da solução depende da concentração, como afirma Silva e Nakagawa (1998c).

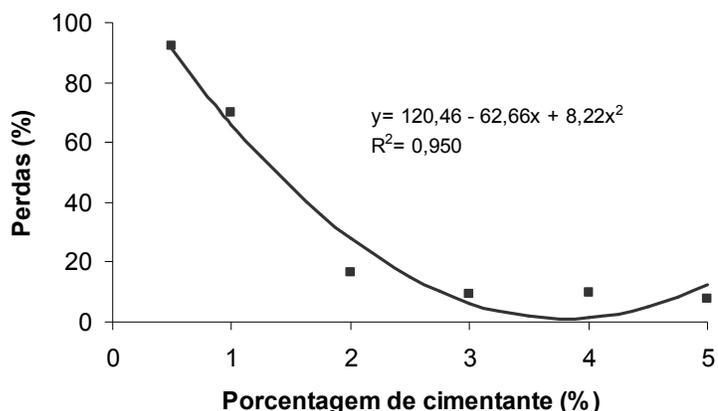


Figura 2. Perda do material de recobrimento em função da porcentagem de cimentante utilizado no recobrimento de sementes de milho (UENF 506-8) após simulação de transporte e semeadura manual.

Nas avaliações de perda do material de recobrimento utilizando semeadura mecânica (Figura 3), as porcentagens de 4 e 5% de cimentante mostraram perdas inferiores às demais porcentagens.

Esses resultados estão de acordo com Silva e Nakagawa (1998c), os quais afirmam que a firmeza da ligação entre as partículas define a consistência do recobrimento e, quanto maior a proporção do cimentante, maior é a ação de fixação das estruturas.

Para a semeadura mecanizada a porcentagem de 4% poderia ser utilizada, desde que não prejudique a qualidade fisiológica das sementes

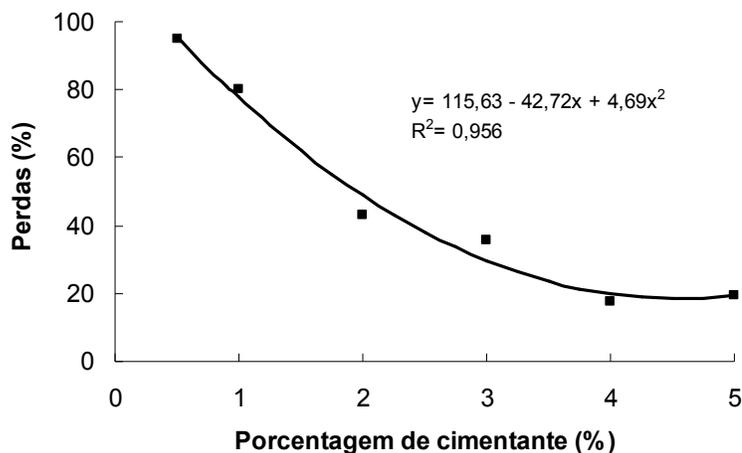


Figura 3. Perda do material de recobrimento em função da porcentagem de cimentante utilizado no recobrimento de sementes de milho (UENF 506-8) após passarem pela semeadora.

Os dados mostram que há necessidade de maior porcentagem de cimentante no recobrimento das sementes que passam pela semeadora em relação à semeadura manual. Isto acontece porque as sementes que passam pela semeadora sofrem maior atrito mecânico, necessitando de maior porcentagem de cimentante para que o recobrimento não desmanche durante o processo.

A porcentagem de plântulas normais obtidas no teste de germinação e teste frio sem solo não foi influenciada pelas diversas porcentagens de cimentante (Tabela 1).

Esses resultados corroboram com Silva et al. (2002), os quais observaram que diversas composições de cimentantes utilizadas no recobrimento não influenciaram a porcentagem de germinação de sementes de alface recobertas.

Tabela 1. Porcentagem de plântulas normais do teste de germinação e teste frio sem solo de sementes de milho (UENF 506-8) recobertas com diferentes porcentagens de cimentante

<b>Tratamentos</b>	<b>Germinação (%)</b>	<b>Teste Frio (%)</b>
Controle	95 a	86 a
0,5% de cimentante	91 a	91 a
1% de cimentante	91 a	91 a
2% de cimentante	91 a	94 a
3% de cimentante	91 a	94 a
4% de cimentante	88 a	91 a
5% de cimentante	90 a	85 a
CV%	7,22	6,97

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nas avaliações da primeira contagem do TG e IVE não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 4). Entretanto, é possível observar uma pequena redução na velocidade de germinação (primeira contagem do TG) e no IVE, quando a porcentagem de cimentante aumentou de 2 para 3 %. Isto pode estar relacionado à maior dificuldade de absorção de água e oxigênio causada pelo aumento da porcentagem de cimentante.

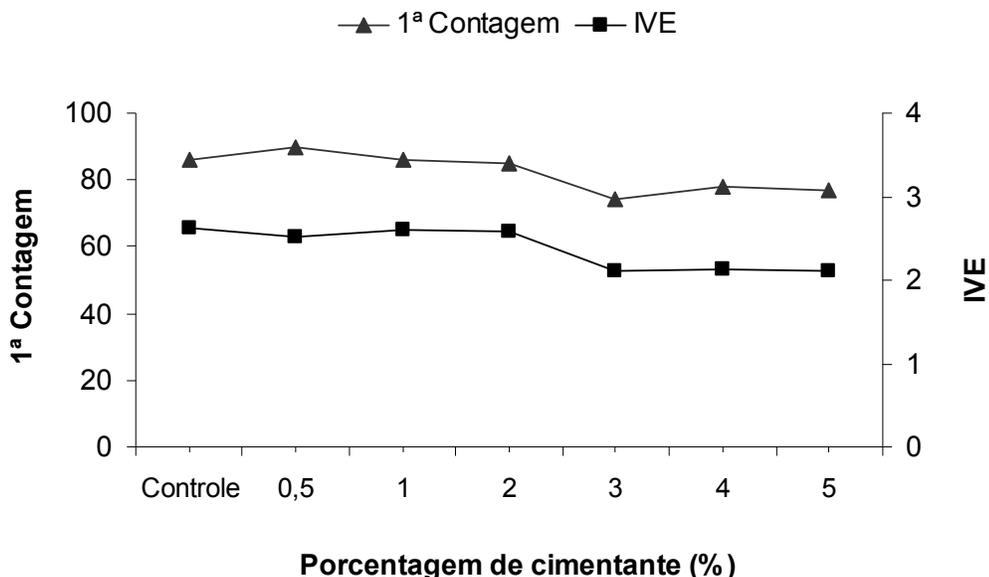


Figura 4. Primeira Contagem do TG e índice de Velocidade de Emergência (IVE) de sementes de milho (UENF-506-8) recobertas com diferentes porcentagens de cimentante. CV= 10,31% (1ª Contagem) e 10,11% (IVE).

A redução na velocidade de germinação (Figura 4) quando a porcentagem de cimentante aumentou de 2 para 3 % não influenciaram o número de plântulas normais no teste de germinação (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com Pires et al. (2004), Oliveira et al. (2003), Pereira e Oliveira (2003) e Silva et al. (2002), os quais também verificaram que a porcentagem de germinação não foi reduzida pelo recobrimento, apesar de a velocidade de germinação das sementes ter sido reduzida em razão da presença de uma barreira física.

Segundo Costa et al. (2001), as sementes recobertas demoram mais tempo para absorver a umidade do solo, podendo tardar a germinação até 48 horas a mais que as sementes nuas. No entanto, as vantagens que o recobrimento pode proporcionar à semeadura de precisão e incorporação de materiais benéficos são mais importantes para se conseguir os objetivos de produção do que o pequeno atraso na germinação.

A emergência em casa de vegetação também apresentou uma pequena redução, não significativa, quando a porcentagem de cimentante aumentou de 2 para 3 % (Figura 5). Estes resultados podem estar relacionados à baixa

porcentagem de água no substrato, pois a areia retém pouca umidade e com isso dificulta a absorção de água pelas sementes com maior porcentagem de cimentante, diminuindo o número de plantas emergidas.

Tomic (1976), trabalhando com sementes de cenoura recobertas e não recobertas, em solo com e sem irrigação, observou que na condição irrigada, os tratamentos equivalem-se. No entanto, sob condições de solo seco, as sementes nuas apresentaram melhor desempenho, podendo concluir que o recobrimento dificulta a absorção de água em condições de baixa disponibilidade de água.

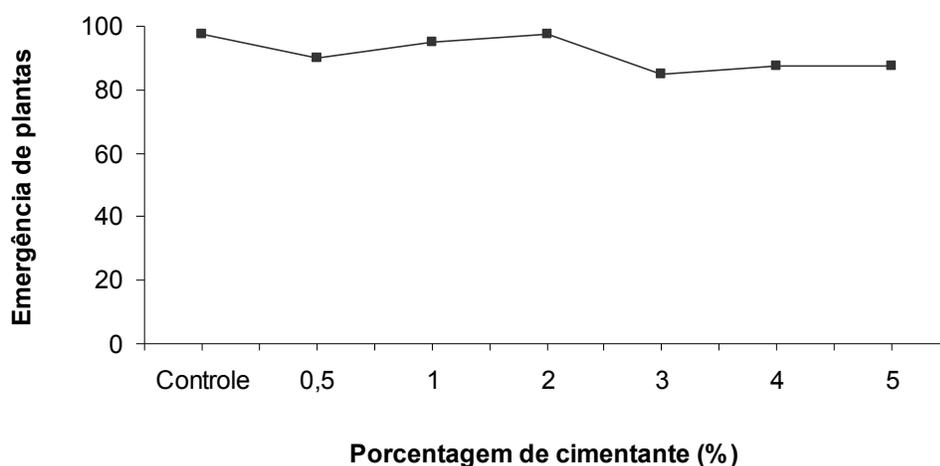


Figura 5. Emergência de plantas em casa de vegetação de sementes de milho (UENF-506-8) recobertas com diferentes porcentagens de cimentante. CV= 10,94%.

Comparando os resultados obtidos no teste de germinação (Tabela 1) e na emergência em casa de vegetação (Figura 5), observa-se que o aumento na porcentagem de cimentante não afetou o número de plântulas normais no teste de germinação, mas na avaliação de emergência em casa de vegetação houve uma pequena redução, não significativa, quando a porcentagem de cimentante aumentou de 2 para 3%. Isso pode estar relacionado à maior disponibilidade de água, temperatura ideal e luminosidade no germinador, durante o teste de germinação, garantindo maior número de plântulas normais.

Esses dados estão de acordo com Caliari e Marcos Filho (1990), que afirmam que se as condições de ambiente após a semeadura em campo se

desviarem das ideais é de se esperar que a porcentagem de emergência de plântulas seja inferior à germinação determinada em laboratório.

Entre as porcentagens de cimentante avaliadas para a semeadura manual, 2 % é a porcentagem recomendada, visto que entre as porcentagens testadas, esta apresentou alta resistência e não afetou a qualidade fisiológica das sementes.

Observando os dados para semeadura mecânica, recomenda-se a porcentagem de 4 % de cimentante, pois esta porcentagem promoveu alta resistência do recobrimento ao atrito mecânico e, possivelmente, em áreas de produção com chuvas regulares ou com um sistema eficiente de irrigação onde não haja limitação de umidade, esta porcentagem de cimentante não afete a emergência das plantas

## **RESUMO E CONCLUSÕES**

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a qualidade fisiológica de sementes de milho UENF 506-8 recobertas e a resistência do recobrimento utilizando diferentes porcentagens de cimentante. Utilizou-se no recobrimento das sementes uma mistura de calcário e meio de cultura. Como cimentante foi utilizada cola a base de acetato de polivinila (PVA). Foram avaliadas seis porcentagens de cimentante: 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 %. Foram realizadas avaliações da resistência do recobrimento simulando o transporte e semeadura manual e a semeadura mecanizada. A avaliação da qualidade fisiológica das sementes recobertas foi realizada pelo teste de germinação (TG), primeira contagem do TG, teste frio sem solo, emergência de plantas em casa de vegetação e IVE.

O recobrimento nas diversas porcentagens testadas não afetou significativamente a qualidade fisiológica das sementes de milho UENF 506-8.

Para a semeadura manual recomenda-se a utilização de 2% de cimentante e para a semeadura mecanizada 4 % de cimentante.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, v.13, p. 65-73.
- BINNECK, E.; BARROS, A. C. S. A.; VAHL, L. C. (1999) Peletização e aplicação de molibdênio em sementes de trevo-branco. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.21, n.2, p. 203-207.
- BRASIL (1992) Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para análise de sementes*. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 365 p.
- CALIARI, M. F.; MARCOS FILHO, J. (1990) Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.). *Revista Brasileira de Sementes*. Brasília, v.12, n.3, p. 52-75.
- COSTA, C. E. L.; SILVA, R. F.; LIMA, J. O. G.; ARAÚJO, E. F. (2001) Sementes de cenoura, *Daucus carota* L., revestidas e peliculadas: germinação e vigor durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, v.26, p. 36-45.
- FRANZIN, S. M.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D. C.; ROVERS, T. (2004) Avaliação do vigor de sementes de alface nuas e peletizadas. *Revista Brasileira de Sementes*, v.26, n.2, p. 114-118.
- GIMÉNEZ-SAMPAIO, T.; SAMPAIO, N. V. (1994) Recobrimento de sementes. *Informativo ABRATES*, v.4, n.3, 52 p.
- HATHCOCK, A. L.; DERNOEDEN, P. H.; TURNER, T. R.; MCINTOSH, M. S. (1984). Tall Fescue and Kentucky Bluegrass Response to Fertilizer and Lime Seed Coatings. *Agronomy Journal*, v.76, p. 879-883.

- KANASHIRO, M.; KAGEYAMA, P. Y.; MÁRQUEZ, F. C. M. (1978). Peletização de sementes de *Eucalyptus* spp. *Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF)*, Piracicaba, v.17, p. 67-73.
- MAGUIRE, J. D. (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for emergence and vigour. *Crop Science*, Madison, v.2, n.2, p. 176-177.
- MEDEIROS, E. M.; BAUDET, L.; PERES, W. B.; EICHOLZ, E. D. (2004) Modificações na condição física das sementes de cenoura em equipamento de recobrimento. *Revista Brasileira de Sementes*, v.26, n.2, p.70-75.
- MENDONÇA, E. A. F. (2003) *Revestimento de sementes de milho superdoce*. Tese (Doutorado em Agronomia), Jaboticabal – SP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do campus de Jaboticabal - UNESP, 63p.
- OLIVEIRA, J. A.; PEREIRA, C. E.; GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, A. R.; SILVA, J. B. C. (2003) Desempenho de sementes de pimentão revestidas com diferentes materiais. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.25, n.2, p. 36-47.
- PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A. (2003) Qualidade Fisiológica e Sanitária de sementes de *Brachiaria decumbens* revestidas e tratadas com inseticida e fungicida. *Informativo Abrates*, v.13, n.3, p. 227 (resumo 331).
- PIRES, L. L.; BRAGANTINI, C.; COSTA, J. L. S. (2004). Armazenamento de sementes de feijão revestidas com polímeros e tratadas com fungicidas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.7, p. 709-715.
- SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. (1998a) Confeção e avaliação de péletes de sementes de alface *Horticultura Brasileira*. Brasília, v.16, n.2, p. 151-158.
- SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. (1998b) Metodologia para avaliação da resistência de péletes. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.16, n.2, p. 118-122.

SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. (1998c) Metodologia para avaliação de materiais cimentantes para peletização de sementes. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.16, n.1, p. 31-37.

SILVA, J. B. C.; SANTOS, P. E. C; NASCIMENTO, W. M. (2002). Desempenho de sementes peletizadas de alface em função do material cimentante e da temperatura de secagem dos péletes. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.20, n.1, p. 67-70.

TOMIC, F. (1976) The effect of irrigation and seed pelleting on carrot yields. *Horticultural Abstracts*, London, v.47, n.4, ref. 3731.

## **RECOBRIMENTO DE SEMENTES COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS**

### **RESUMO**

A aplicação de bactérias promotoras de crescimento que incluem, por exemplo, a intensificação de processos biológicos como a fixação de nitrogênio atmosférico em plantas não leguminosas, apesar de ter grande potencial para agricultura, ainda mostra algumas limitações, como a carência de um inoculante eficiente e comercialmente disponível. Objetivou-se no presente trabalho avaliar o efeito do recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos (AH), bactérias diazotróficas endofíticas e uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas na estimulação do crescimento vegetal. O estudo foi conduzido em laboratório e casa de vegetação. Em Laboratório, a adição de AH, bactéria e o uso em conjunto de bactérias e AH estimularam o crescimento vegetal. No experimento em casa de vegetação, em vasos tipo Leonard, preenchidos com areia, foi observado que o uso em conjunto de bactérias e AH + AH irrigado estimulou o crescimento vegetal em relação ao controle. Utilizando uma mistura de terra + areia, a inoculação das bactérias de maneira isolada aumentou o crescimento das plantas em relação ao controle. O uso em conjunto de bactérias e AH não estimulou o crescimento das plantas. Os resultados mostrados nesse trabalho revelaram que os AH utilizados no recobrimento de sementes tem sua capacidade de estimular o crescimento radicular diminuído, comparado ao uso em

solução. O recobrimento de sementes mostrou-se como uma nova opção de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), garantindo a sobrevivência dessas bactérias até a emissão das raízes pelas plantas.

### ABSTRACT

The application of bacteria growth promoters includes, for example, the intensification of biological processes as the fixation of atmospheric nitrogen in non-legume plants, although to have great potential for agriculture, still shows some limitations, as the lack of an efficient and commercially available inoculante. This work had for objective to evaluate the effect of the covering seeds of maize with humic acid (HA), endophytic diazotrophic bacteria and use in set of AH and endophytic diazotrophic bacteria in the stimulation of the vegetal growth. The study was evaluated at laboratory and greenhouse. In Laboratory, the addition of HA, bacteria and the use in set of bacteria and HA stimulated the vegetable growth. In the experiment in greenhouse, with sand, it was observed that the use in set of bacteria and HA + HA irrigated stimulated the vegetal growth in relation to the control. In the mixture land + sand, the inoculation of the bacteria in isolated way increased the growth of the plants in relation to the control. The use in set of bacteria and HA did not stimulate the growth of the plants. The results shown in this work show that HA used in the covering seeds it has its capacity of stimulation of the growth to radicular diminished, comparative with the use in solution. The covering seeds revealed as a new option of inoculation of endophytic diazotrophic bacteria of the species *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), guaranteeing the survival of these bacteria until the emission of the roots for the plants.

## INTRODUÇÃO

No final do século retrasado descobriu-se que várias espécies de leguminosas, tais como soja, feijão e outras, possuíam nódulos nas raízes contendo bactérias do gênero *Rhizobium*, que transformam o nitrogênio gasoso do ar em amônia que é utilizada para o crescimento da planta. Este processo foi chamado de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (Boddey et al., 1992).

A família Poaceae engloba os grãos mais utilizados na alimentação humana e em rações, tais como milho, trigo, arroz e sorgo, e ainda plantas forrageiras (capim colômbio, braquiária etc), bem como a principal alternativa energética para substituição da gasolina como combustível, a cana-de-açúcar. Todas estas espécies de planta são incapazes de formar nódulos nas raízes em associação com o rizóbio. Estudos envolvendo bactérias fixadoras de nitrogênio (N) associadas às Poáceas iniciaram-se no Brasil em 1956 e na década de 80 foi comprovado com ajuda de novas técnicas de quantificação, que algumas destas espécies de plantas podem obter contribuições significativas de N com a atividade destes microrganismos (Boddey e Döbereiner, 1988).

Os microrganismos diazotróficos endofíticos mais conhecidos e que se estabelecem em tecidos de raízes e partes aéreas das poáceas são *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azoarcus* e *Burkholderia* sp., dentre outras espécies bacterianas. Tais endófitos apresentam grande potencial na FBN devido à sua habilidade em colonizar toda a planta e estabelecer-se dentro de nichos protegidos do oxigênio ou de outros fatores, podendo expressar seu grande potencial para fixação de N em grau máximo (Kennedy et al., 1997).

O uso das bactérias diazotróficas endofíticas representa um grande potencial para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos. O aumento do custo dos adubos nitrogenados e a preocupação cada vez maior, no exterior e no Brasil, com possíveis efeitos negativos do excesso de nitrato nos mananciais são fatores que devem ser levados em consideração para o incentivo do estudo do processo natural de fixação biológica (Cantarella e Duarte, 2004). Assim, todas as possibilidades de incremento da FBN na agricultura devem ser

exploradas, não somente como alternativa econômica, mas, também ecológica (Canuto, 2003).

No entanto, há outros efeitos das bactérias diazotróficas endofíticas sobre a planta hospedeira, além da contribuição da FBN, que estão sendo estudados. Por exemplo, as bactérias diazotróficas endofíticas podem desempenhar um papel fisiológico importante no desenvolvimento da planta hospedeira, como o biocontrole de fitopatógenos (Oliveira et al., 2003), a supressão de doença por indução de resistência localizada e/ou sistêmica (Duijff et al., 1997 citado por Perin et al., 2003) e promoção do crescimento vegetal por mecanismos diferentes da FBN (Mirza et al., 2001). A promoção do crescimento vegetal pelas bactérias também tem sido atribuída à produção de hormônios que são capazes de promover o crescimento e alterações na geometria do sistema radicular, resultando numa absorção mais eficiente de água e nutrientes (Mirza et al., 2001).

Bastián et al. (1998) detectaram a presença de auxinas (AIA) e giberelinas A1 e A3 em culturas de *H. seropedicae* e *Acetobacter diazotrophicus*, ambas as bactérias endofíticas, enquanto Radwan et al. (2004) constataram a produção de indóis por estirpes de *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em plântulas de milho e arroz inoculadas. A produção desses hormônios pode gerar benefícios da associação das bactérias endofíticas com a planta hospedeira.

As bactérias diazotróficas endofíticas penetram na planta hospedeira pelas aberturas naturais e injúrias. Nas raízes, um dos sítios de entrada mais utilizados pelas bactérias endofíticas são as injúrias causadas pela emergência de raízes laterais (Cerigioli, 2006).

Segundo Marques Júnior (2006), os ácidos húmicos (AH) podem atuar no aumento da população de bactérias diazotróficas introduzidas no interior da planta e conseqüente incremento dos efeitos benéficos sobre a planta hospedeira. Isso pode ser hipoteticamente explicado como parte dos efeitos dos AH que promovem o crescimento vegetal pelo maior enraizamento e aumentam o número de sítios de mitose e emergência de raízes laterais, aumentando o número de pontos de infecção para as bactérias.

O uso de AH em solução pode influenciar diretamente o desenvolvimento e o crescimento das plantas (Zandonadi, 2006; Canellas et al., 2005; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002; Chen e Avid, 1990). Os AH constituem a fração alcalina solúvel da matéria orgânica do solo que precipita em meio fortemente

ácido. A estimulação no crescimento vegetal que os AH promovem, especialmente sobre crescimento radicular, é ainda objeto de debate. Uma série de autores postula que o principal efeito sobre o enraizamento constitui no aumento da absorção de micronutrientes pela formação de complexos orgânicos mais solúveis (Pinton et al., 1999). Porém, a forte estimulação no crescimento de raízes de plantas crescidas em meio axênico e sem nutrientes indica a possibilidade de outros efeitos, tais como os observados com uso de hormônios.

Canellas et al. (2002) identificaram a ativação das bombas de  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática (MP) em raízes de milho, que foi correlacionada com a presença de AIA na estrutura dos AH e com alterações no desenvolvimento radicular das plântulas. O gradiente eletroquímico gerado pela  $H^+$ -ATPase da MP está diretamente envolvido com dois mecanismos fundamentais do desenvolvimento vegetal: (i) a energização de sistemas secundários de translocação de íons fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes e (ii) o aumento da plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e divisão da célula vegetal (Façanha et al., 2002).

Existe, portanto, um grande potencial para ser explorado o uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas na estimulação do crescimento vegetal.

Com este trabalho objetivou-se avaliar o efeito do recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos (AH), bactérias diazotróficas endofíticas e uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas na estimulação do crescimento vegetal. Para isso foram avaliadas as plantas obtidas de sementes recobertas, germinadas em laboratório e casa de vegetação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada neste estudo a estirpe *H. seropedicae* Z67 BR 11175, isolado obtido de raízes de arroz superficialmente desinfestadas (Baldani et al., 1986), proveniente da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica, RJ. Para a preparação do inóculo para recobrimento, uma colônia do isolado da estirpe foi inoculada em meio DYG's (Rodrigues Neto

et al., 1986), permanecendo sob agitação a 150 rpm por 24h a 30 °C. Uma alíquota de 30 µL da cultura crescida foi transferida para frascos de vidro (volume 12 mL) contendo 5 mL de meio JNFb semi-sólido (Baldani et al., 1992). Os frascos foram incubados para o crescimento e formação da película por 72h a 30 °C. Em parte dos frascos de vidro houve adição de AH isolado de vermicomposto, na concentração de 40 mgL<sup>-1</sup>, cedido pelo Laboratório de Solos do CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.

O recobrimento das sementes de milho foi realizado com a mistura de 70% (p/p) de calcário, 10% (p/p) de meio de cultura semi-sólido JNFb e 20% (p/p) de água destilada. Foi adicionado a essa mistura 2 % de agente cimentante. As sementes foram recobertas uma a uma com auxílio de uma pinça e, em seguida, postas a secar ao ar livre, durante um período de 24 horas, sobre um recipiente polvilhado com calcário a fim de evitar que as mesmas ficassem aderidas ao fundo do recipiente. Em seguida as sementes foram avaliadas em condições de laboratório e casa de vegetação.

## 1. Experimentos em Laboratório

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Fitotecnia no Setor de Produção e Tecnologia de Sementes pertencente ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes - RJ. Os tratamentos avaliados foram: T1= sementes recobertas com adição de meio de cultura JNFb semi-sólido (Controle); T2= sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH; T3= sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias e T4= sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH + bactérias.

O experimento foi instalado seguindo o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos. Os resultados provenientes das avaliações foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade.

Foram realizadas as seguintes avaliações: a) **Teste de germinação:** realizado de acordo com as recomendações contidas nas Regras para Análises de Sementes (Brasil, 1992), com modificações. Para tal, utilizaram-se oito

repetições de 25 sementes distribuídas em papel germiteste, umedecido com uma quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Após a semeadura os rolos foram colocados no interior de sacos plásticos e estes foram colocados em um germinador à temperatura alternada de 20-30 °C. A avaliação das plântulas foi realizada no sétimo dia após a instalação do teste, sendo os resultados obtidos expressos em porcentagem de plântulas normais; b) **Massa fresca da raiz e parte aérea:** as plântulas foram obtidas na avaliação do teste de germinação; dez plântulas de cada tratamento foram seccionadas separando a raiz da parte aérea, e estas foram pesadas individualmente; c) **Massa seca da raiz e parte aérea:** as raízes e parte aérea das plântulas da avaliação da massa fresca, após serem pesadas, foram colocadas em sacos de papel, identificados, os quais foram levados para estufa de ventilação forçada de ar regulada à 60 °C onde permaneceram por 72 horas; d) **Comprimento e Área Radicular:** as plântulas utilizadas para a avaliação do comprimento e área radicular foram obtidas na avaliação do teste de germinação. Foram selecionadas dez plântulas de cada tratamento. As plântulas foram retiradas do germinador, envolvidas em papel toalha umedecido e conservadas temporariamente sob refrigeração até o momento de seu processamento analítico. Para tal, os segmentos radiculares foram distribuídos sobre a placa do escaner, de forma a evitar qualquer sobreposição entre os eixos radiculares. Posteriormente, as imagens salvas em arquivos de extensão TIFF foram analisadas para comprimento radicular e a área radicular com auxílio do software *Delta-T scan* Cambridge (Bouma et al., 2000); e) **Análise dos sítios de mitose e raízes laterais emergidas:** foi realizado de acordo com Canellas et al. (2002). As plântulas utilizadas foram obtidas na avaliação do teste de germinação. Foram selecionadas 4 plântulas de cada tratamento. Os segmentos nodais das raízes foram clareados em solução de KOH 0,5%, em banho-maria a 75 °C por 20 minutos. Decorrido este período, o material foi lavado em água destilada e posto para corar por um período de 24 horas em hematoxilina-férrica. Após esse período, as raízes foram lavadas em água destilada e clareadas com solução aquosa de ácido láctico a 80% em banho maria a 75 °C por 30 a 90 segundos. As raízes foram transferidas individualmente para placas de petri com água destilada e observadas em microscópio esterioscópico para contagem dos sítios mitóticos, que aparecem como pontos vermelhos em um fundo claro, bem como a contagem de raízes laterais; f) **Contagem de bactérias:**

as plântulas utilizadas para a contagem de bactérias foram obtidas na avaliação do teste de germinação. A contagem de bactérias presentes no tecido radicular foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP). O número de bactérias na raiz, expresso em log (n° de bactérias por g de massa fresca de raiz) foi determinado tomando-se amostras de 1g de raízes por repetição. Cada tratamento constou de três repetições. As amostras foram trituradas em 9 mL de solução salina (Döbereiner et al., 1995), diluídas seriadamente até  $10^{-7}$  e inoculadas em meio JNFb semi-sólido para *H. seropedicae*, utilizando-se três repetições por diluição. Os frascos foram incubados a 30 °C por sete dias, decorrido este período foi realizada a avaliação do crescimento pela presença de uma película branca na superfície do meio. O número de bactérias foi obtido pela consulta à tabela de McCrady para três repetições por diluição e os valores obtidos sofreram transformação logarítmica.

## **2. Experimentos em casa de vegetação – areia**

As avaliações foram realizadas em casa de vegetação do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes - RJ. O experimento constou de oito tratamentos: T1) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido (controle); T2) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH; T3) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias; T4) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias + AH; T5) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido (controle) + AH em solução; T6) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH + AH em solução; T7) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias + AH em solução; T8) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH + bactérias + AH em solução.

As sementes recobertas foram semeadas em vasos Leonard, quatro sementes por vaso, e sete dias após a semeadura foi realizado um desbaste, selecionando duas plântulas por vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e irrigados diariamente com 150 mL de solução nutritiva desenvolvida por Furlani e Furlani (1988) com modificações. Nos primeiros quatro dias de

aplicação as plantas foram irrigadas com solução 1/3 força, após mais quatro dias com solução ½ força, e com solução 1 força até completar 40 dias. Uma parte dos vasos foi irrigada diariamente com a solução nutritiva acrescida de AH (40 mg L<sup>-1</sup>). Aos 40 dias após a semeadura as plantas foram coletadas. Foi realizada a contagem de bactérias nas raízes das plantas, massa fresca e seca da parte aérea e raiz.

O experimento foi instalado seguindo o delineamento inteiramente casualizado. A contagem de bactérias foi realizada com 3 repetições e as avaliações de massa fresca e seca da parte aérea e raiz avaliadas com 4 repetições. Os resultados provenientes das avaliações foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

### 3. Experimentos em casa de vegetação – terra + areia

As avaliações foram realizadas em casa de vegetação do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes - RJ. Para o preenchimento dos vasos foram utilizadas amostras do horizonte superficial de um solo classificado como Latossolo Amarelo Coeso Típico (Embrapa, 1999). A análise química do solo está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo Latossolo Amarelo Coeso Típico

Análise química do Solo													
C	N	pH (H <sub>2</sub> O)	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	T	H+Al	T	SB	V	m
dag/kg	g/kg		mg/dm <sup>3</sup>		-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----							---	---
1,00	0,10	5,10	8,2	44	1,25	0,84	0,14	2,37	3,51	5,71	2,20	39	5,9

Vasos plásticos com capacidade de 5 L foram preenchidos com uma mistura de solo e areia (1:1). A areia foi misturada ao solo devido ao seu alto teor de argila. Os tratamentos avaliados foram: T1) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido (controle); T2) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH; T3) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias; T4) sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH + bactérias.

Foram semeadas quatro sementes por vaso e, sete dias após a semeadura, foi realizado um desbaste, mantendo-se duas plantas por vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e irrigados com o uso de um regador, semanalmente. Aos 40 dias após a semeadura efetuou-se a coleta das plantas de todos os tratamentos. A contagem de bactérias nas raízes das plantas, massa fresca e seca da parte aérea e raiz foram avaliadas.

O experimento foi instalado seguindo o delineamento inteiramente casualizado. A contagem de bactérias foi realizada com 3 repetições e as avaliações de massa fresca e seca da parte aérea e raiz avaliadas com 4 repetições. Os resultados provenientes das avaliações foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Experimentos em Laboratório

A inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas (*H. seropedicae* Z67) e a adição de AH em sementes de milho recobertas não afetaram a germinação das sementes (Tabela 2). Isto indica que o potencial de estimulação do crescimento pelos AH ou pelas bactérias pode ser avaliado em plântulas oriundas de sementes recobertas com adição de AH e inoculação de bactérias. Ferreira et al. (2003) inocularam sementes de arroz com as estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE 94 e *Burkholderia brasilensis* M130, utilizando turfa e caldo

bacteriano, e também não observaram diminuição na germinação dessas sementes.

Tabela 2. Germinação de sementes de milho (var. UENF 506-8) recobertas e inoculadas com meio de cultura contendo *Herbaspirillum seropedicae* Z67 e adição de AH

<b>Tratamentos</b>	<b>Germinação (%)</b>
Controle	93,75 a
Meio + AH	93,75 a
Meio + Bactéria	95,00 a
Meio + AH + Bactéria	96,25 a
CV (%)	8,84

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

A adição de ácidos húmicos (AH), a inoculação de bactérias e o uso combinado BacAH aumentaram 34, 38 e 26 % a massa fresca das raízes em relação ao controle (Tabela 3). Resultados superiores foram observados por Marques Júnior (2006) em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar da variedade NA 5679, plantadas em areia. Observou-se incremento de 238, 91 e 215% nos tratamentos com AH, bactérias e o uso combinado BacAH, respectivamente. O efeito das substâncias húmicas sobre o desenvolvimento vegetal depende do tipo e idade das plantas e da concentração das substâncias húmicas no meio (Kononova, 1982, citado por Rodda et al., 2006) e, além disso, se em estado sólido ou em solução. A maior parte dos experimentos utilizando AH como promotores de crescimento é realizada com soluções de AH, tais como utilizado por Marques Júnior (2006).

O efeito fisiológico dos AH, ou pelo menos parte dele, está relacionado à presença de estruturas químicas semelhantes a dos hormônios vegetais. Por exemplo, Muscolo et al. (1998) detectaram a presença de AIA em solução de AH por meio de imunoenaios e Canellas et al. (2002), por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Uma nova proposta para a estrutura e conformação química para os AH foi mostrada por Piccolo (2001), que postulou que diferentemente de uma macromolécula de elevada massa molecular os AH consistem de uma reunião de várias unidades estruturais de massa relativamente pequena que são estabilizadas por interações fracas, principalmente, hidrofóbicas perto da neutralidade e por pontes de  $H^+$  em pH ácido. Esse arranjo supramolecular para os AH foi corroborado por Simpson et al. (2002), que utilizando ressonância magnética nuclear (RMN) com campo ordenado e difuso, observaram uma mobilidade diferencial dos AH quando tratados com pequenas concentrações de ácidos orgânicos. Assim, em solução, os AH podem “liberar” pequenas estruturas de sua conformação em resposta a variações no meio, tais como, exsudação das plantas. Façanha et al. (2002) observaram evidente variação na distribuição da massa molecular de uma solução de AH com a presença de raízes. Por meio da cromatografia por exclusão de tamanho em gel em coluna preenchida com Sephadex, observou-se aumento da presença de unidades estruturais de menor massa molecular na solução de AH em contato por poucas horas com as raízes.

É esperada uma diminuição dessa possibilidade de alteração da conformação molecular dos AH no estado sólido, devido ao aumento das forças de interação e a baixa solubilidade do material húmico em água. Dessa forma, é possível que unidades estruturais portadoras de atividade biológica não apresentem a mesma atividade química que em solução.

Tabela 3. Massa fresca de raiz e parte aérea de plântulas de milho (var. UENF 506-8) oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Tratamentos	Massa fresca (mg/planta)	
	Raiz	Parte Aérea
Controle	322,7 b	431,4 b
Meio + AH	433,2 a	538,7 a
Meio + Bactéria	446,6 a	606,7 a
Meio + AH + Bact.	406,7 ab	543,1 a
CV (%)	23,35	18,94

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Em relação ao acúmulo de massa fresca da parte aérea (Tabela 3), pode-se observar que a adição de AH, a inoculação de bactérias e o uso combinado BacAH aumentaram, significativamente, o desenvolvimento da parte aérea em relação ao controle. Esses resultados estão de acordo com Perin et al. (2003), que observaram aumentos significativos no acúmulo de massa fresca da parte aérea de plântulas de milho aos seis dias após a inoculação das estipes *H. seropedicae* Z67 e *Azospirillum brasilense* Sp7, inoculadas isoladamente ou misturadas.

Os resultados da avaliação de massa seca da raiz e parte aérea estão apresentados na Tabela 4. A adição de AH, inoculação de bactérias e o uso combinado de BacAH estimularam o aumento da massa seca da raiz em 19, 23 e 8%, respectivamente, em relação ao controle. A massa seca da parte aérea aumentou 15, 22 e 11%, respectivamente.

Tabela 4. Massa seca de raiz e parte aérea de plântulas de milho (var. UENF 506-8) oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Tratamentos	Massa seca (mg/planta)	
	Raiz	Parte Aérea
Controle	35,7 a	39,3 a
Meio + AH	42,4 a	45,1 a
Meio + Bactéria	43,8 a	47,8 a
Meio + AH + Bact.	38,6 a	43,8 a
CV (%)	24,8	20,5

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Observando a Tabela 3 e 4, verifica-se um incremento maior na massa fresca da parte aérea e raiz em relação à massa seca da parte aérea e raiz, indicando que o estímulo verificado no crescimento das plantas poderia ser hipoteticamente atribuído à ação dos ácidos húmicos e bactérias sobre o alongamento celular por turgescência vacuolar.

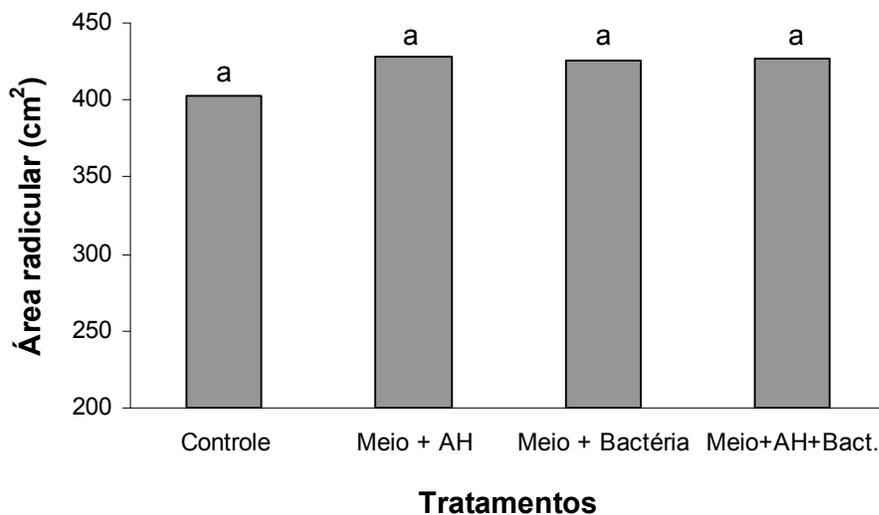
O crescimento radicular, em nível celular, ocorre através de dois estádios: o crescimento meristemático e o crescimento vacuolado. No crescimento meristemático as células se dividem por mitose e iniciam um processo de aumento de tamanho relativamente lento. Estas células são deslocadas para uma região posterior de rápida expansão, situada entre 4 e 15  $\mu\text{m}$  após o ápice radicular, denominada zona de alongamento. A célula meristemática recém-dividida contém muitos vacúolos. À medida que os vacúolos aumentam de volume, estes passam a se fundir num só vacúolo central. (Rodda et al., 2006). O crescimento vacuolado que ocorre na zona de alongamento é caracterizado por uma rápida expansão celular sustentada pelo aumento da captação de água pelos vacúolos (Cosgrove, 1997).

Zandonadi (2006) observou forte estímulo no bombeamento de  $\text{H}^+$  pelas V-ATPase e  $\text{H}^+$ Pirofosfatase vacuolares induzido por AH isolados de várias fontes de matéria orgânica. O aumento na atividade das bombas vacuolares é compatível com o maior aumento observado na massa fresca das raízes.

As bombas de  $\text{H}^+$ -ATPases da membrana plasmática tem um papel central no crescimento e na expansão celular, que estão relacionadas com a teoria do crescimento ácido que postula que o aumento da extrusão de prótons mediado pelas  $\text{H}^+$ -ATPases induz ação de enzimas específicas que atuam sobre a parede celular aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento das células (Rayle e Cleland, 1992). O aumento do gradiente de  $\text{H}^+$  gerado pelas bombas de  $\text{H}^+$  implica na ativação dos transportadores secundários de íons, promovendo sua entrada na célula e posterior acúmulo no vacúolo e geração da pressão osmótica, que possibilita a entrada de água (Maurel e Chrispeels, 2001).

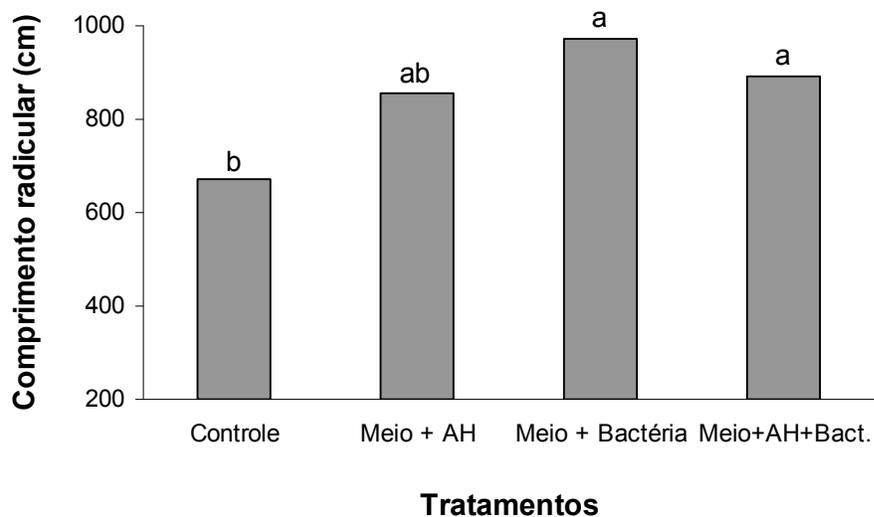
Não foi observada alteração na área radicular (Figura 1). Porém, no comprimento radicular (Figura 2) os tratamentos com inoculação de bactérias e uso combinado de BacAH mostraram um aumento, significativo, em relação ao controle, indicando uma alteração sensível na morfologia da raiz.

O alongamento do eixo radicular é a medida mais sensível para avaliar estresses em plantas em relação à avaliação da área radicular, área foliar, massa seca da parte aérea, massa seca das raízes e massa seca total (Vasconcelos, 1997).



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Figura 1. Área radicular de plântulas de milho (var. UENF 506-8) oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH. CV= 13,08%.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Figura 2. Comprimento radicular de plântulas de milho (var. UENF 506-8) oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH. CV= 26,59%.

Os mecanismos responsáveis por esta estimulação no crescimento vegetal ainda não são bem esclarecidos. A presença de N e de outros nutrientes nas cinzas dos AH é muito baixa (produzindo uma concentração aproximada de  $N = 9,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $Si = 1,92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $Fe = 7,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $Al = 4,67 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $Zn = 2,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e de  $Cu = 7,7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ), desta forma, efeitos nutricionais diretos não justificam totalmente o incremento no crescimento radicular (Marques Júnior et al., 2007). O crescimento radicular pode estar relacionado aos efeitos estimulantes dos AH resultantes do aumento na atividade das bombas de  $H^+$  que parece favorecer a indução da emissão de pêlos radiculares, de raízes laterais finas como afirma Canellas et al. (2005).

As bactérias diazotróficas endofíticas também atuam sobre o desenvolvimento radicular. Olivares et al. (2002) constataram um aumento na atividade das  $H^+$ -ATPases isoladas da membrana plasmática provenientes de raízes infectadas por bactérias diazotróficas endofíticas. Os autores verificaram alteração significativa na arquitetura radicular de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (cv. RB72454) inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas. Ferreira (2002) também observou estímulo da atividade das  $H^+$ -ATPases e aumento do crescimento das plantas de cana-de-açúcar (cv. RB72454) inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* estirpe HRC54.

Observando a Tabela 5, verifica-se que o número de raízes emergidas (NRE) foi inferior nos tratamentos com a adição de AH, bactérias e o uso combinado BacAH em relação ao controle. Possivelmente, na idade em que as plantas foram avaliadas (7 dias) a adição dos AH e a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas ainda não havia estimulado o NRE.

Segundo Canellas et al. (2002), a ação dos AH pode variar conforme a idade da planta avaliada. Os autores verificaram o número de sítios de mitose em plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos isolados de vermicomposto, durante sete dias. Do primeiro ao terceiro dia, o número de sítios de mitose não foi estatisticamente superior ao controle, os maiores valores foram encontrados entre o terceiro e o quarto dia de exposição das raízes às substâncias húmicas.

A idade da planta também pode influenciar a ação das bactérias diazotróficas endofíticas. Olivares et al. (2002) avaliaram plantas de cana-de-açúcar inoculadas a 10, 20, 40 e 60 dias com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. Os resultados indicaram que durante

as fases iniciais do processo da colonização das bactérias, ambas as estirpes estimularam a atividade das bombas de H<sup>+</sup>-ATPase, causando mudanças na morfologia das raízes.

Tabela 5. Número de raízes emergidas (NRE) e número de sítios de mitose (NSM) de plântulas de milho (var. UENF 506-8) oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

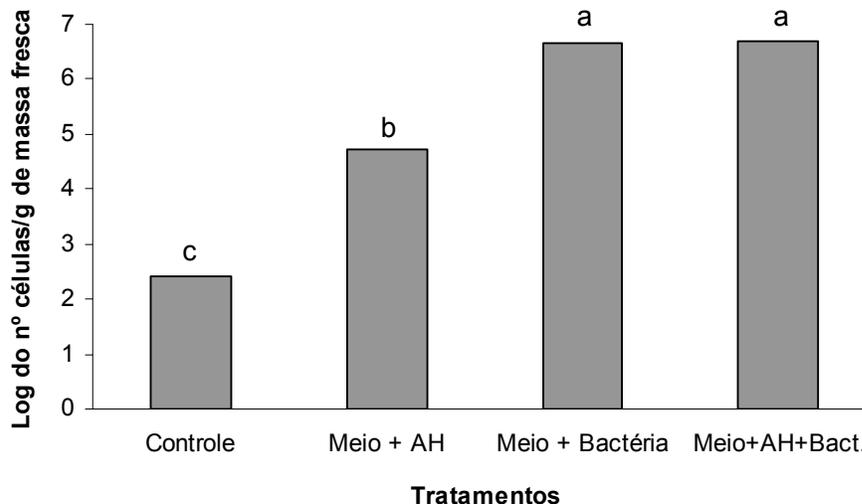
<b>Tratamentos</b>	<b>NRE</b>	<b>NSM</b>
Controle	182 a	50,0 ab
Meio + AH	126 b	79,0 a
Meio + Bactéria	129 b	36,5 b
Meio + AH + Bact.	110 b	58,0 ab
CV (%)	15,62	41,78

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

A adição de AH e o uso combinado de BacAH estimularam o aumento do NSM em 58 e 16%, respectivamente. Segundo Marques Júnior (2006), os AH promovem aumento da atividade das bombas de H<sup>+</sup> nas raízes e, como consequência, aumento do número de sítios de mitose.

A contagem do número de bactérias diazotróficas, pelo número mais provável (NMP), revelou um aumento, significativo, no número de bactérias nos tratamentos com adição de bactérias, AH e uso combinado BacAH em relação ao controle. Foi observado previamente que os AH não interferem negativamente no crescimento de microrganismos endofíticos e em determinadas concentrações podem estimular o crescimento bacteriano. Além disso, foi observado que as bactérias não utilizam os AH como fonte de carbono, mas podem utilizá-lo como fonte de N (Marques Júnior, 2006), embora a atividade da nitrogenase não seja afetada. Em solução foi observado forte estímulo na colonização das bactérias diazotróficas, mesmo em plantas não inoculadas, representando uma ação sobre a população da microbiota nativa (Marques Júnior, 2006). O recobrimento com AH provocou um estímulo semelhante.

Como mostra a Figura 3 o recobrimento com bactérias foi eficiente em proporcionar aumento no número de células bacterianas nas raízes.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Figura 3. Contagem do número de bactérias diazotróficas (expresso em log do número de células por grama de tecido fresco) em raízes de plântulas de milho (var. UENF 506-8) recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH. CV= 6,46%.

O recobrimento de sementes consistiu numa técnica eficiente para aumentar o número de microrganismos fixadores de N em plântulas de milho. Provavelmente, o efeito do recobrimento com AH de maneira isolada estimulou a população nativa. Esses resultados revelam uma técnica promissora para o desenvolvimento de inoculantes para bactérias diazotróficas endofíticas.

## 2. Experimentos em casa de vegetação – areia

As plantas irrigadas com AH e oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias e AH (meio+bact.+AH+AH irrig.) apresentaram aumento de 30, 27, 19 e 25% nas avaliações de massa fresca da parte aérea e raiz, massa seca da parte aérea e raiz, respectivamente (Tabela 6), em relação ao controle.

Para a estimulação das plantas foi necessária a concentração de AH suprida pelo recobrimento e pela irrigação e a inoculação das bactérias diazotróficas endofíticas. O efeito dos AH sobre o desenvolvimento vegetal depende da concentração de AH no meio, o que está de acordo com Rodda et al. (2006). Observou-se também um incremento maior na massa fresca da parte aérea e raiz em relação à massa seca da parte aérea e raiz indicando que o estímulo verificado no crescimento das plantas poderia ser atribuído à ação dos ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas sobre o alongamento celular por turgescência vacuolar.

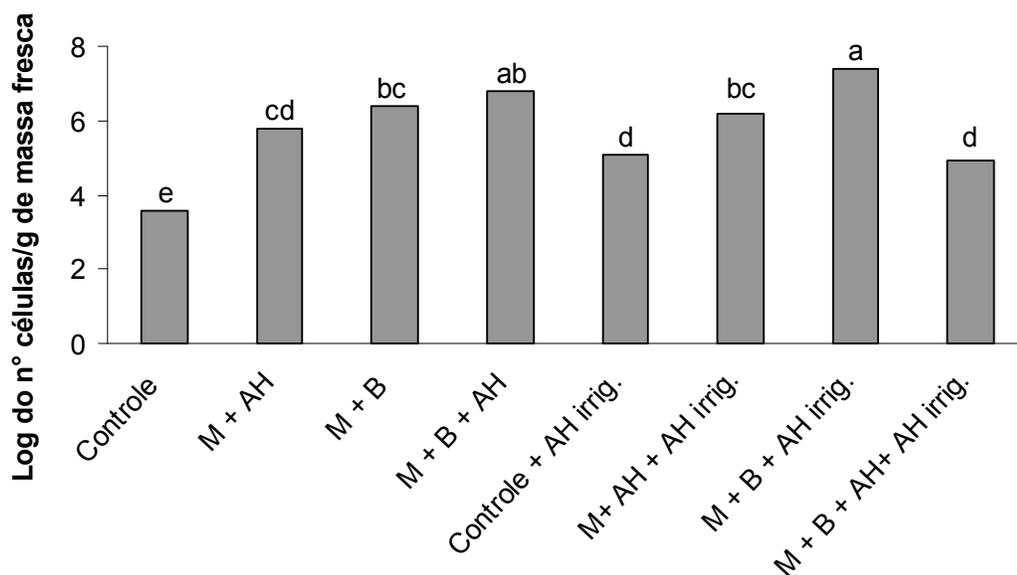
Na contagem do número de bactérias diazotróficas pelo número mais provável (NMP) (Figura 4), observa-se que todos os tratamentos foram, estatisticamente, superiores ao controle não irrigado com AH, mostrando que a inoculação das bactérias pelo recobrimento de sementes foi eficiente, e a presença dos AH não interferiram negativamente no crescimento das bactérias e estimularam a população da microbiota nativa.

Tabela 6. Massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca radicular (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) de plântulas de milho (var. UENF 506-8), crescidas em vasos Leonard, oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Tratamentos	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
Controle	27,49 ab	20,31 ab	3,08 a	1,50 ab
Meio + AH	24,80 b	19,78 ab	2,86 a	1,64 ab
Meio + Bact.	26,53 b	20,46 ab	2,97 a	1,52 ab
Meio + Bact.+ AH	25,89 b	20,52 ab	2,96 a	1,43 ab
Controle + AH irrig.	25,81 b	19,65 ab	2,89 a	1,46 ab
Meio + AH + AH irrig.	26,15 b	14,15 b	2,89 a	1,21 b
Meio + Bact.+ AH irrig.	25,40 b	17,26 ab	2,80 a	1,32 ab
Meio + Bact.+ AH+ AH irrig.	35,68 a	25,81 a	3,66 a	1,88 a
CV (%)	20,99	29,8	19,57	26,67

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

O tratamento M+AH+AHirrig., apesar de receber adição de AH através do recobrimento de sementes e irrigação e apresentar colonização de bactérias diazotróficas (Figura 4), não estimulou o crescimento das plantas (Tabela 6) em relação ao controle. Neste tratamento não houve inoculação de bactérias através do recobrimento de sementes, provavelmente, essas bactérias inoculadas nestas plantas são provenientes da contaminação natural por bactérias diazotróficas presentes na própria semente, na água ou no ambiente. Estas, possivelmente, não promovem efeito na estimulação das plantas como a estirpe de bactéria selecionada inoculada ou podem estar funcionando como dreno de fotoassimilados devido à população elevada das mesmas.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Figura 4. Contagem do número de bactérias diazotróficas (expresso em log do número de células por grama de tecido fresco) em raízes de plântulas de milho (var. UENF 506-8), crescidas em vasos Leonard, oriundas de sementes recobertas com adição bacteriana, AH e o uso combinado de bactérias e AH. CV= 8,94.

O estímulo na colonização observado em plântulas de milho foi mantido no ensaio em areia. Os dados são consistentes, indicando a técnica de

recobrimento bastante promissora como meio de inoculação das bactérias endofíticas diazotróficas (*Herbaspirillum seropedicae* Z67).

### **3. Experimentos em casa de vegetação – terra + areia**

As avaliações mostraram que a inoculação das bactérias isoladamente aumentou em 15, 57, 19 e 72% a massa fresca da parte aérea e radicular, massa seca da parte aérea e radicular, respectivamente, em relação ao controle (Tabela 7). Esses resultados estão de acordo com Guimarães et al. (2003), que observaram aumento de até 111% na massa seca das plantas inoculadas com as estirpes ZAE72, ZAE94 e ZAL152 (*H. seropedicae*), da variedade de arroz Guarani crescidas durante 40 dias em vasos com solo em casa de vegetação.

A adição de AH no recobrimento não aumentou o crescimento das plantas em relação ao controle (Tabela 7). Simpson et al. (2006), com ajuda da técnica de RMN, indicaram que os componentes da matéria orgânica que contém grupos polares, cadeias e anéis hidrofóbicos são adsorvidos pela superfície da argila. Assim, é possível que os AH tenham sido adsorvidos e a concentração de AH ativa quimicamente diminuiu e com isso houve diminuição da estimulação do crescimento das plantas no substrato terra + areia, já que o efeito no desenvolvimento das plantas dependente da concentração dos AH disponíveis (Rodda et al., 2006).

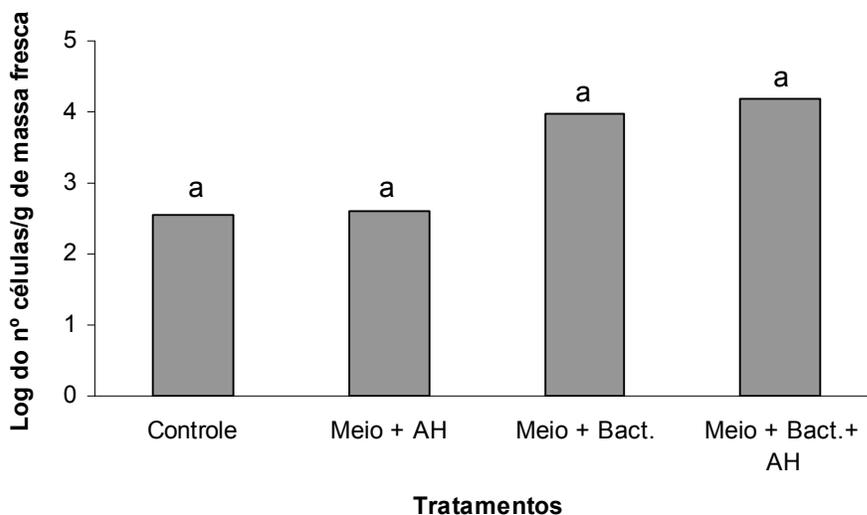
Tabela 7. Massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca radicular (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) de plântulas de milho (var. UENF 506-8), crescidas em vasos com solo, oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Tratamentos	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
Controle	7,15 a	13,59 a	0,79 a	1,04 ab
Meio + AH	6,28 a	15,08 a	0,75 a	1,32 ab
Meio + Bact.	8,26 a	21,35 a	0,94 a	1,79 a
Meio + Bact.+ AH	6,63 a	12,80 a	0,75 a	0,93 b
CV (%)	28,51	36,42	29,50	40,30

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Pela análise da população de bactérias presentes nos tecidos das plantas pode-se observar que o recobrimento foi eficiente como meio de inoculação das bactérias, houve um aumento de 57 e 64 % nos tratamentos Meio + Bactéria e Meio + Bactéria + AH, em relação ao controle (Figura 5).

Em solo + areia, o efeito dos AH sobre a população nativa não foi observado. Além disso, o uso combinado BacAH não aumentou a inoculação de bactérias inoculadas (*Herbaspirillum seropedicae*) em relação ao tratamento Meio + Bact.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Figura 5. Contagem do número de bactérias diazotróficas (expresso em log do número de células por grama de tecido fresco) em raízes de plântulas de milho (var. UENF 506-8), crescidas em vasos com solo, oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH. CV= 49,57.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho teve-se por objetivo avaliar o efeito do recobrimento de sementes de milho UENF 506-8 com ácidos húmicos (AH), bactérias diazotróficas endofíticas e uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas na estimulação do crescimento vegetal. O estudo foi conduzido em laboratório e casa de vegetação, ambos pertencentes ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes – RJ.

Em Laboratório, a adição de AH, bactéria e o uso em conjunto de bactérias e AH estimularam o crescimento vegetal. A inoculação das bactérias pelo recobrimento de sementes foi eficiente, revelando uma técnica promissora e de baixo custo. Os AH estimularam a colonização da microbiota nativa.

Em vasos Leonard, preenchidos com areia, foi observado que o uso combinado de bactérias e AH + AH irrigado estimulou o crescimento vegetal.

Na mistura terra + areia, a inoculação das bactérias isoladamente estimulou o crescimento das plantas. O uso em conjunto de bactérias e AH não estimulou o crescimento das plantas.

Os dados das avaliações em laboratório e casa de vegetação mostram que, para a utilização do recobrimento de sementes para adição dos AH, serão necessárias avaliações com diferentes concentrações de AH adicionadas ao recobrimento.

O recobrimento de sementes mostrou-se como uma nova opção de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), garantindo a sobrevivência dessas bactérias até a emissão das raízes pelas plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.36, p.86-93.
- BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, v.13, p. 65-73.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, v.24, p.7-11.

- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. (1988) Nitrogen fixation associated with grasses and cereal : recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.108, p. 53-65.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ASSIS, R. L.; DÖBEREINER, J. (1992) Fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas a cana-de-açúcar. *Comunicado Técnico*, nº 6, p. 1 -5.
- BOUMA, T. J.; NIELSEN, K. L.; KOUTSTAAL, B. (2000) Sample preparation and seanning protocolol computer analysis of root length and diameter. *Plant and soil*, v.218, p. 185-196
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para análise de sementes*. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CANELLAS, L. P.; OLIVEIRAS, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; FAÇANHA, A. R. (2002). Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiology*, v.130, p. 1951–1957.
- CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; MÉDICI, L. O.; PERES, L. E. P.; OLIVARES, F. L; FAÇANHA, A. R. (2005) Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. In: CANELLAS, L. P; SANTOS; G. A. *HUMOSFERA. Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes – RJ, p. 224 – 243.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. (2004). Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V., *Tecnologias de Produção do milho*. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 139-182.

- CANUTO, E. L. *Seleção de Bactérias Diazotróficas Endofíticas para Uso com Insumo Biológico em Plantas de Cana-de-açúcar oriundas de sementes.* (2003) Tese (Mestrado em Agronomia) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 72 p.
- CERIGIOLI, M. M. (2006). *Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (Zea Mays L.) e potencial para promoção de crescimento.* Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos, 132 p.
- CHEN, Y.; AVAID, T. (1990). Effects of humic substances on plant growth. In: MACCARTHY, P.; CLAPP, C. E. MALCOM, R. L.; BLOOM, P. R. (Eds) *Humic substances in soils and Crop Science: Selected Readings*, Madison. Soil Science Society of America, p. 161-186.
- COSGROVE, D. J. Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. (1997) *Plant Cell*, v.9, p.1031-1041.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. (1995) *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.* Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí-RJ. EMBRAPA-CNPAB, 60p.
- DUIJFF, B.; GIANINIZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. (1997) Involvement of the outer membrane lipopoly saccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WC417r. *New Phytology*, Oxford, v.135, p.325-334.
- EMBRAPA-CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOLOS (1999) *Sistema Brasileiro de classificação de solos.* Rio de Janeiro: Embrapa. 412 p.

- FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A. L. O.; OLIVARES, F. L.; GURIDI, F.; SANTOS, G. A.; VELLOSO, A. C. X.; RUMJANEK, V. M.; BRASIL, F.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M. A.; CANELLAS, L. P. (2002). Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.37, n.9, p. 1301-1310.
- FERREIRA, F. P. (2002) *Promoção do crescimento de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (Híbridos interespecíficos de Saccharum) por bactérias diazotróficas endofíticas*. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 68p.
- FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. (2003) Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Agronomia*, v.37, n.2, p. 06 – 12.
- FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. (1988) Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas. *Boletim Técnico* n° 121, Instituto Agrônomo, 34 p.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. (2003) Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. *Agronomia*, v.37, n.2, p. 25 - 30.
- KENNEDY, I. R.; GERK-PEREG, L. L.; WOOD, C.; DEAKER, R.; GILCHRIST, K.; KATUPITIYA, S. (1997) Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil*, v.194, p.65-79.
- KONONOVA, M. M. (1982) *Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona, Oikos-Tau. 364p.

- MARQUES JÚNIOR, R. B. (2006). *Potencial do uso combinado de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas para bioestimulação de plantas*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 88p.
- MARQUES JÚNIOR, R. B.; SILVA, L. G.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. (2007) Promoção do enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas (prelo *Pesquisa Agropecuária Brasileira*)
- MAUREL, C.; CHRISPPEELS, M. J. (2001) Aquaporins, A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*, v.125, p. 135-138.
- MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LAFIT, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*. v.237, p. 47-54.
- MUSCOLO, A.; CUTRUPI, S.; NARDI, S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.30, p. 1199-1201.
- OLIVARES, F. L.; FERREIRA, F. P.; SILVA, L. G.; FAÇANHA, A. R.; RAMOS, A. C.; NETTO; A. T.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, V. M.; MIGUENS, F. C. (2002) Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction symposium on nitrogen fixation with non-legumes, Leuven: Book of abstracts of 9<sup>th</sup> *international Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes*, p. 38.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. (2003) Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. *Documento 161*, Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ. 40p.

- PERIN, L.; SILVA, M. F.; FERREIRA, J. S.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. (2003) Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. *Agronomia*, v.37, n.2, p.47-53.
- PICCOLO, A. (2001) The Supramolecular Structure of Humic Substances. *Soil Science*. v.166, n.11, p. 810-832.
- PINTON, R., CESCO, S., IACOLETTI, G., ASTOLFI, S., VARANINI, Z. (1999). Modulation of nitrate uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant and Soil*, v.215, 155-163.
- RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. (2004). Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.10, p.987-994.
- RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. (1992) The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive and Well. *Plant Physiology*, v.99, 1271-1274
- RODDA, M. R. C.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R.; ZANDONADI, D. B.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. A.; SANTOS, G. A. (2006) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, p. 649-656.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri Tipo B. *Suma Phytopathologica*, v.12, p.16.
- SIMPSON, A. J. (2002) Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organica matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.40, p. 572-582.

SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J.; KINGERY, W. L.; LEFEBVRE, B. A.; MOSER, A.; WILLIAMS, A. J.; KVASHA, M.; KELLEHER, B. P. (2006) The application of  $^1\text{H}$  High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR for the Study of Clay-Organic Associations in Natural and Synthetic Complexes. *Langmuir*, v.22, p. 4498-4503.

VASCONCELOS, S. S. *Métodos de avaliação da tolerância à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz (Oryza sativa L.)* (1997) Tese (Mestrado em Ciência do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 134 p.

ZANDONADI, D. B. (2006). *Bioatividade de Substâncias Húmicas: Promoção do desenvolvimento radicular e atividade das bombas de  $\text{H}^+$* . Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 159 p.

## SEMENTES DE MILHO RECOBERTAS: GERMINAÇÃO, VIGOR E VIABILIDADE DO INÓCULO DURANTE O ARMAZENAMENTO

### RESUMO

Considerando que o recobrimento de sementes de milho é uma técnica eficiente para inoculação de bactérias da espécie *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67, torna-se necessário avaliar o comportamento das sementes recobertas e das bactérias inoculadas no recobrimento ao longo do tempo. Este trabalho foi desenvolvido objetivando-se avaliar o período de sobrevivência das células bacterianas no recobrimento, a qualidade fisiológica das sementes recobertas armazenadas e o efeito da presença dos ácidos húmicos (AH) na sobrevivência das bactérias no recobrimento das sementes. Utilizou-se neste estudo a estirpe *H. seropedicae* Z67 BR 11175, isolada de arroz, proveniente da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica, RJ. O recobrimento das sementes de milho UENF 506-8 foi realizado com a mistura de 70% (p/p) de calcário, 10% (p/p) de meio de cultura semi-sólido JNFb e 20% (p/p) de água destilada. Foi adicionado a essa mistura 2 % (p/p) de cimentante. As sementes foram acondicionadas durante três meses, em sacos de papel multifoliado e armazenadas em dois ambientes: ambiente de laboratório, no qual a temperatura e umidade relativa (UR) foram monitoradas com o uso de termohigrógrafo, e incubadora BOD a 20 °C e 70 ± 5 % UR. A cada 30 dias de armazenamento foram efetuadas determinações do teor de água, contagem de

bactérias e avaliações da qualidade fisiológica das sementes. O recobrimento das sementes não alterou a perda da qualidade fisiológica das sementes em relação às sementes nuas durante o armazenamento. Dentre as condições de armazenamento estudadas, a mais adequada para a manutenção da qualidade fisiológica das sementes foi o ambiente de laboratório. Nos tratamentos onde foi realizada a inoculação de bactérias pelo recobrimento de sementes foi detectado a presença das células bacterianas nas raízes das plântulas oriundas de sementes armazenadas por até 60 dias. A presença dos AH não alterou a sobrevivência das células bacterianas no recobrimento das sementes.

### ABSTRACT

Considering that the corn seed covered is an efficient technique in the inoculation of bacteria of the species *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), it is necessary to evaluate the behavior of the covered seeds and of the bacteria inoculated in the covering along the time. This work was developed with the objective of evaluating the period of survival of the bacterial cells in the covering, the physiologic quality of the seeds covered stored and the effect of the presence of humic acids (HA) in the survival of the bacteria in the covering of the seeds. It was used in this study the lineage *H. seropedicae* Z67 BR 11175, isolated of rice, originating from the collection of bacteria of Embrapa. The covering of the corn seeds UENF 506-8 was executed with the mixture of 70% (w/w) of lime, 10% (w/w) of middle of semi-solid culture JNFb and 20% (w/w) of water. The was added that mixture 2% (w/w) of cement. The seeds were conditioned, for three months, in paper bags and stored in two atmospheres: laboratory, and BOD 20°C and 70 ± 5%. Every 30 days of storage determinations of the water content, counting of bacteria and evaluations of the physiologic quality of the seeds were made. The covering seeds did not modify the loss of physiological quality of the seeds in relation to the seeds not covered during the storage. Among the storage conditions studied, the most appropriate for the maintenance of the physiologic quality of the seeds was the laboratory. In the treatments where the inoculation of bacteria was accomplished by the covering seeds the presence of the bacterial cells it was detected in the

roots of the plants originating from of seeds stored for up to 60 days. The presence of HA didn't alter the survival of the bacterial cells in the covering seeds.

## INTRODUÇÃO

O aumento do custo dos adubos nitrogenados e a preocupação cada vez maior, no exterior e no Brasil, com possíveis efeitos negativos do excesso de nitrato nos mananciais são fatores que devem ser levados em consideração para o incentivo ao estudo do processo natural de fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Cantarella e Duarte, 2004). Esse processo é realizado por microrganismos chamados de diazotróficos (bactérias e cianobactérias fixadoras de nitrogênio).

Para que a fixação biológica seja explorada em seu máximo potencial, é necessário que estirpes eficientes estabeleçam-se nas raízes das plantas. Quando a população microbiana no solo não é grande ou as estirpes não são eficientes, torna-se necessário recorrer a métodos artificiais de introdução de estirpes selecionadas. A prática de inoculação é muito divulgada e adotada, principalmente em leguminosas (Coelho, 2001).

Para a inoculação do rizóbio em leguminosas até o momento da simbiose, o material de inoculação que tem demonstrado ser o mais apropriado é a turfa. Para a proteção do inoculante as sementes são recobertas com materiais como fosfatos de rocha e carbonato de cálcio, contribuindo para um micro-ambiente favorável à sobrevivência da bactéria (Giménez-Sampaio e Sampaio, 1994).

Em poáceas, os microrganismos diazotróficos endofíticos mais conhecidos e que se estabelecem nos tecidos das raízes e partes aéreas das plantas são *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azoarcus* e *Burkholderia* sp., dentre outras espécies bacterianas. Tais endófitos apresentam grande potencial na FBN devido à sua habilidade em colonizar a planta como um todo e estabelecer-se dentro de nichos protegidos do oxigênio ou de outros fatores, podendo expressar seu grande potencial para fixação de nitrogênio em grau máximo (Kennedy et al., 1997).

A eficiência da produção de inoculantes para poáceas, assim como em leguminosas, depende, entre outros fatores, da manutenção do número mínimo

de células viáveis da bactéria no inoculante desde a sua fabricação até o uso pelo agricultor (Ferreira et al., 2003).

Ferreira et al. (2003) avaliaram três tipos de inoculantes para bactérias diazotróficas endofíticas: turfa, inoculante oleoso e caldo bacteriano. Os autores observaram que o recobrimento com turfa foi o mais eficiente na inoculação das bactérias. O inoculante oleoso dificultou a germinação das sementes e o caldo bacteriano manteve por pouco tempo a sobrevivência das células bacterianas.

O recobrimento de sementes poderia ser uma forma de inoculação das bactérias diazotróficas endofíticas em poáceas, mas para isso são necessárias novas pesquisas avaliando o período de sobrevivência das células bacterianas no recobrimento e a qualidade fisiológica das sementes recobertas ao longo do tempo.

Apesar do acentuado incremento no uso de sementes recobertas verificado nos últimos anos, são poucas as informações que têm sido publicadas sobre a resposta destas sementes durante o período de armazenamento (Mendonça, 2003; Oliveira et al., 2003a). Entretanto, acredita-se que os princípios fundamentais para a correta conservação das sementes recobertas são os mesmos reconhecidos para as sementes nuas (Duffus e Slaughter, 1980, citado por Costa et al., 2001).

Segundo Marcos Filho (2005), a longevidade das sementes é variável com o genótipo, mas o período de manutenção do potencial fisiológico depende, em grande parte, do teor de água e das condições do ambiente de armazenamento.

A umidade relativa (UR) do ar tem estreita relação com o teor de água da semente, que, por sua vez, governa a ocorrência dos diferentes processos metabólicos que ela pode sofrer, ao passo que a temperatura influencia a velocidade dos processos bioquímicos e interfere, indiretamente, sobre o teor de água das sementes (Carvalho e Nakagawa, 2000). Desta forma, as melhores condições para manutenção da qualidade de sementes ortodoxas são aquelas que mantêm o embrião em sua mais baixa atividade metabólica, em geral, em condições de baixa umidade relativa do ar e baixa temperatura (Carvalho e Nakagawa, 2000).

A presença de ácidos húmicos (AH) no recobrimento possivelmente pode aumentar a eficiência da infecção das bactérias nas plantas. Segundo Marques

Júnior (2006), os AH estimulam o aumento de raízes laterais e sítios mitóticos, aumentando os pontos de infecção para as bactérias diazotróficas endofíticas.

Assim, objetivou-se nesse estudo avaliar o período de sobrevivência das células bacterianas no recobrimento, a qualidade fisiológica das sementes recobertas armazenadas e o efeito da presença dos AH na sobrevivência das bactérias no recobrimento das sementes.

## MATERIAL E MÉTODOS

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Fitotecnia no Setor de Produção e Tecnologia de Sementes pertencente ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes - RJ.

Utilizou-se neste estudo a estirpe *H. seropedicae* Z67 Br 11175, isolada obtida de raízes de arroz superficialmente desinfestadas (Baldani et al., 1986), proveniente da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica, RJ.

Para preparação do inóculo para o recobrimento, uma colônia do isolado da estirpe foi inoculada em meio DYG's (Rodrigues Neto et al., 1986), permanecendo sob agitação a 150 rpm por 24h a 30 °C. Uma alíquota de 30 µL da cultura crescida foi transferida para frascos de vidro (volume 12 mL) contendo 5 mL de meio JNFb semi-sólido (Baldani et al., 1992). Os frascos foram incubados para o crescimento e formação da película por 72h a 30 °C. Em parte dos frascos de vidro houve adição de AH isolado de vermicomposto, na concentração de 40 mg L<sup>-1</sup>, cedido pelo Laboratório de Solos do CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.

O recobrimento das sementes de milho UENF 506-8 foi realizado com a mistura de 70% (p/p) de calcário, 10% (p/p) de meio de cultura semi-sólido JNFb e 20% (p/p) de água destilada. Foi adicionado a essa mistura 2 % de agente cimentante (p/p).

As sementes foram recobertas uma a uma com auxílio de uma pinça e, em seguida, postas a secar ao ar livre, durante um período de 24 horas, sobre um

recipiente polvilhado com calcário a fim de evitar que as sementes ficassem aderidas ao fundo do recipiente.

Os tratamentos avaliados foram: T1= sementes nuas (controle); T2= sementes recobertas com adição de meio de cultura JNFb semi-sólido; T3= sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH; T4= sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias e T5= sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias + AH.

As sementes foram acondicionadas durante três meses em sacos de papel multifoliado e armazenadas em dois ambientes: ambiente de laboratório, no qual a temperatura e umidade relativa (UR) foram monitoradas a cada três dias com termohigrógrafo, e incubadora BOD a 20 °C e 70 ± 5 % UR.

A cada 30 dias de armazenamento foram efetuadas determinações do teor de água, contagem de bactérias e avaliações da qualidade fisiológica das sementes pelo teste de germinação (TG), primeira contagem do TG e teste de frio sem solo.

O teor de água das sementes expresso em base úmida foi determinado segundo as prescrições das Regras de Análise de Sementes (Brasil, 1992), pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 horas, utilizando-se duas amostras de quatro a cinco gramas de sementes para cada tratamento.

O teste de germinação (TG) foi realizado de acordo com as recomendações contidas nas Regras para Análises de Sementes (Brasil, 1992), com modificações, sendo utilizado quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento.

A primeira contagem do TG foi realizada conforme metodologia prescrita para o TG, sendo o resultado expresso pela porcentagem das plântulas normais avaliadas no quarto dia após o início do teste.

Para execução do teste de frio sem solo, quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento foram distribuídas em papel germiteste umedecido com uma quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Após a semeadura os rolos foram colocados no interior de sacos plásticos e estes foram mantidos em incubadora BOD regulada a 10 °C, durante sete dias. Após esse período, os rolos no interior dos sacos plásticos foram transferidos para um germinador regulado à temperatura alternada de 20-30 °C, onde permaneceram

por mais sete dias. A avaliação da germinação foi realizada de acordo com as recomendações contidas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

A contagem de bactérias presentes no tecido radicular foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP). As plântulas utilizadas para a contagem de bactérias foram obtidas na avaliação do teste de germinação. O número de bactérias na raiz foi determinado tomando-se amostras de 1g de raízes por repetição. Cada tratamento constou de três repetições. As amostras foram trituradas em 9 mL de solução salina, diluídas seriadamente até  $10^{-7}$  e inoculadas em meio JNFb semi-sólido com adição de ácido nalidíxico (10 mg/L), utilizando-se três repetições por diluição. Os frascos foram incubados a 30 °C por sete dias, decorrido este período foi realizada a avaliação do crescimento pela presença de uma película branca na superfície do meio. O número de bactérias foi obtido pela consulta a tabela de McCrady para três repetições por diluição e os valores obtidos sofreram transformação logarítmica.

O experimento foi instalado seguindo o delineamento inteiramente casualizado. Utilizou-se um esquema fatorial 5 X 2 X 4, correspondente a cinco tratamentos (sementes nuas; sementes recobertas com adição de meio de cultura JNFb semi-sólido; sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH; sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias e sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias + AH), dois ambientes de armazenamento (incubadora BOD e laboratório) e quatro períodos de armazenamento (0, 30, 60, 90 dias). Os dados foram submetidos à análise de variância (F a 5% de probabilidade). Os graus de liberdade dos fatores isolados, assim como da interação entre os fatores foram desdobrados via teste de comparação de médias (fatores qualitativos) e análise de regressão (fatores quantitativos).

Os resultados da contagem de bactérias pela técnica do NMP para os tratamentos sementes nuas, meio e meio + AH foram apresentados através das médias obtidas durante o armazenamento das sementes, pois nenhum modelo de regressão descreveu o comportamento dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura e a UR foram monitoradas a cada três dias, mas nas figuras 1 e 2 encontram-se as temperaturas e UR do ar (média, máxima e mínima) do ambiente de laboratório durante o armazenamento obtidas da média de cada 5 avaliações (15 dias).

A temperatura média no período de armazenamento foi de 26,4 °C, com temperatura média máxima de 27,2 °C e temperatura média mínima de 25,2 °C. Observa-se que a temperatura do laboratório foi, durante todo o período de armazenamento, superior à temperatura da incubadora BOD (20 °C).

A UR média do ar no laboratório foi de 61,5%, com UR média máxima de 65,7 % e UR média mínima de 54,1 %. A umidade relativa do ar média no laboratório foi inferior a UR da incubadora BOD ( $70 \pm 5$  %).

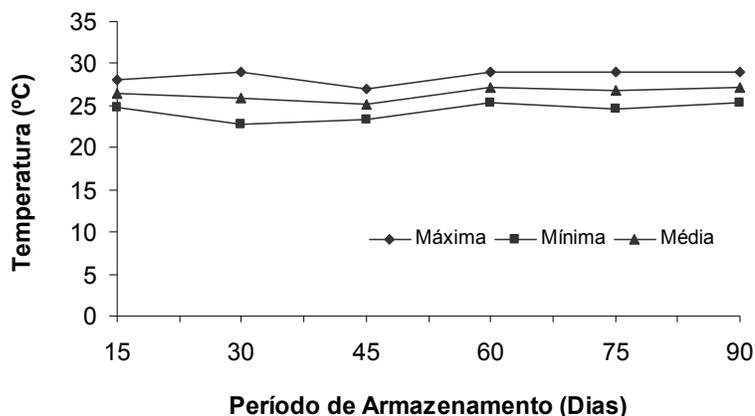


Figura 1. Variação das temperaturas máxima, mínima e média em laboratório durante o armazenamento das sementes de milho UENF 506-8.

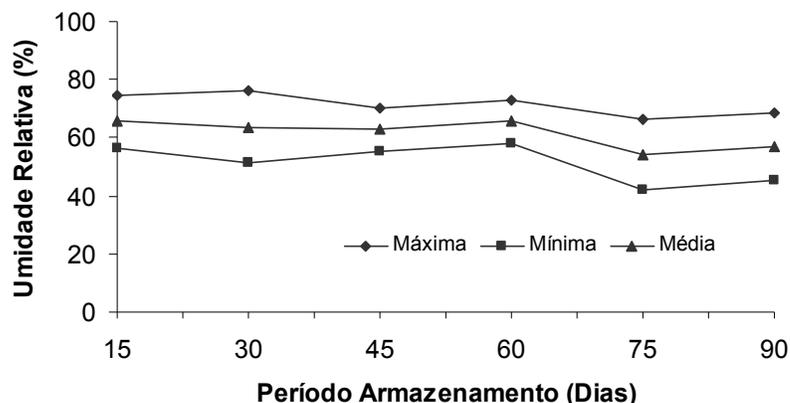


Figura 2. Variação das umidades relativa máxima, mínima e média no laboratório durante o armazenamento das sementes de milho UENF 506-8.

As médias do teor de água das sementes, determinadas ao 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento, para cada tratamento, são apresentadas na Tabela 1.

Durante o armazenamento foi possível verificar que as sementes armazenadas em laboratório, inclusive o controle, mostraram-se com valores de teor de água mais baixos em relação às sementes armazenadas em incubadora BOD, indicando que as embalagens permitiram trocas de umidade com o meio e com isso a UR mais baixa e a maior temperatura no laboratório aumentaram a perda de água das sementes.

Tabela 1. Teor de água (base úmida) em porcentagem, determinado durante o armazenamento de sementes de milho (UENF 506-8) nuas e recobertas

Ambiente	Tratamentos	Período de Armazenamento (Dias) <sup>1</sup>			
		0	30	60	90
Incubadora BOD	Sementes Nuas (Controle)	11,12	11,95	12,40	12,34
	Meio	14,29	8,85	7,66	8,27
	Meio + AH	12,61	7,53	8,70	8,54
	Meio + Bactérias	16,20	7,38	9,23	7,99
	Meio + AH + Bactérias	16,35	8,44	7,53	7,88
Laboratório	Sementes Nuas (Controle)	11,12	10,04	10,39	8,95
	Meio	14,29	7,04	7,27	6,39
	Meio + AH	12,61	7,23	8,92	5,65
	Meio + Bactérias	16,20	6,00	7,77	6,06
	Meio + AH + Bactérias	16,35	6,16	6,70	4,82

No início do armazenamento (tempo 0) as sementes recobertas continham maior teor de água do que as nuas, devido ao maior teor de água presente no material de recobrimento. Na mistura do recobrimento é adicionado água e com isso há um aumento do teor de água nas sementes recobertas logo após o recobrimento. No entanto, durante o armazenamento, as sementes recobertas mostraram valores de teor de água consideravelmente mais baixos do que os verificados para sementes nuas, indicando que a água presente no recobrimento das sementes é perdida mais rapidamente do que a água das sementes, diminuindo o teor de água das sementes recobertas.

Para comprovar que o baixo teor de água nas sementes recobertas é devido à perda de água pelo recobrimento, foi avaliado o teor de água das sementes nuas, sementes recobertas, sementes descobertas (o material do recobrimento foi retirado) e do recobrimento, todos armazenados por 90 dias. Os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Teor de água (base úmida) em porcentagem das sementes nuas, recobertas, descobertas e do recobrimento armazenados a 90 dias

Tratamentos	Teor de água (%)
Sementes nuas	9,95
Sementes recobertas	6,03
Sementes descobertas	9,93
recobrimento	0,47

Os dados mostraram que as sementes descobertas possuem um teor de água igual ao das sementes nuas, enquanto as sementes recobertas mostram um valor inferior. O recobrimento mostrou um teor de água extremamente baixo, sendo ele o componente responsável pelo menor teor de água das sementes recobertas. Portanto, pode-se considerar que o calcário forma um recobrimento com baixa retenção de umidade como também foi observado por Silva e Nakagawa (1998).

Observando os dados da primeira contagem do TG (Tabela 3), constatou-se efeito significativo do ambiente de armazenamento, sendo os valores obtidos para as sementes armazenadas no laboratório superiores aos das sementes armazenadas em incubadora BOD. Possivelmente, a maior umidade relativa no interior da incubadora BOD causou maior deterioração das sementes sendo este ambiente menos eficiente na manutenção do vigor das sementes avaliado pela primeira contagem do TG.

Resultados similares foram observados por Cisneiros et al. (2003) em sementes de araçazeiro armazenadas em laboratório (70 a 74,8 %UR) e freezer (90 %UR). Foi observado que as sementes armazenadas em laboratório mostraram melhores resultados na primeira contagem do TG e índice de velocidade de germinação.

A alta umidade relativa no interior da incubadora BOD e a embalagem permeável onde estavam acondicionadas as sementes provocaram maior deterioração das sementes como relatam Freitas et al. (1992).

Tabela 3. Primeira contagem do teste germinação de sementes de milho UENF 506-6 em função do ambiente de armazenamento

<b>Ambiente</b>	<b>Primeira contagem do teste de germinação</b>
Laboratório	83,84 a
Incubadora BOD	80,74 b

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da Figura 3 mostram que a germinação das sementes nuas foi mais lenta quando comparadas às sementes recobertas. Possivelmente, o recobrimento das sementes, ao ser umedecido, dissolveu facilmente e não formou uma barreira física à germinação das sementes, além disso, o pH menos ácido em torno das sementes recobertas, devido à presença do calcário, pode ter beneficiado a germinação mais rápida das mesmas.

Esses dados discordam de Oliveira et al. (2003 a e b) e Giménez-Sampaio e Sampaio (1994), os quais relatam que sementes recobertas demoram mais tempo para germinar do que as sementes nuas.

A adição das bactérias e dos AH não influenciou a qualidade fisiológica das sementes em relação ao tratamento com recobrimento somente com meio de cultura (Figura 3).

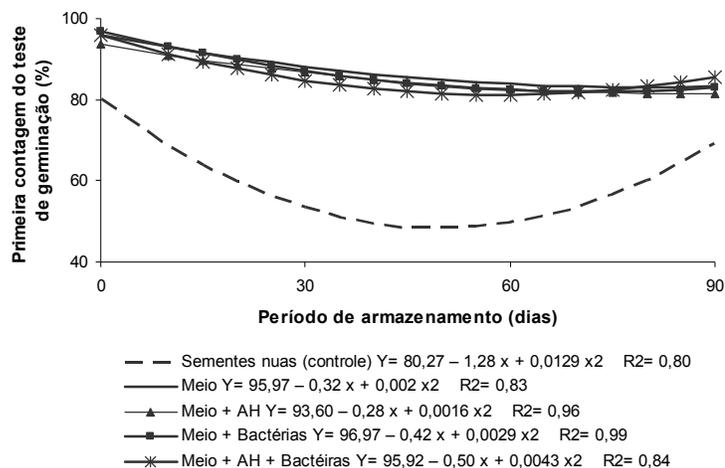


Figura 3. Primeira contagem do teste germinação de sementes de milho UENF 506-6 nuas, recobertas com meio, meio + AH, meio + bactérias e meio + AH + bactérias durante armazenamento.

Como observado para a primeira contagem do TG, o ambiente de laboratório também proporcionou resultados superiores à incubadora BOD para o teste de germinação (Tabela 4).

Segundo Andrade e Pereira (1997), o armazenamento de sementes sob temperaturas mais baixas é benéfico para muitas espécies, algumas vezes essencial, mas é prejudicial a outras.

Tabela 4. Germinação de sementes de milho UENF 506-6 em função do ambiente e período de armazenamento

Ambiente	Primeira contagem do teste de germinação
Laboratório	98,0 a
Incubadora BOD	96,3 b

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se que houve redução significativa na germinação das sementes durante o armazenamento (Figura 4). Para o teste de germinação não houve diferença significativa entre os tratamentos pela análise do teste F a 5% de

probabilidade. Assim, na figura 4 foi apresentada somente uma curva para todos os tratamentos. O decréscimo de vigor verificado nas sementes nuas e recobertas pode ser atribuído ao processo natural de deterioração inevitável das sementes

Esses resultados estão de acordo com Oliveira et al. (2003a), os quais também verificaram redução da qualidade das sementes nuas e recobertas de pimentão ao longo do armazenamento quando estas foram armazenadas em embalagem permeável.

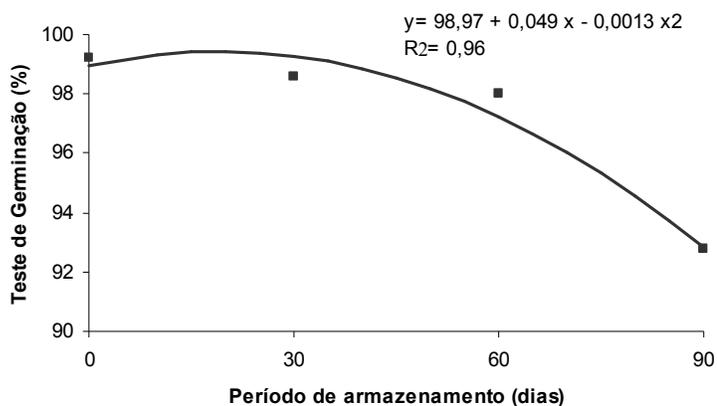


Figura 4. Germinação de sementes de milho UENF 506-6 durante o armazenamento.

Na avaliação do teste frio não foi observada diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade para o ambiente de armazenamento.

Não houve diferença significativa entre as sementes nuas e recobertas pelo teste de frio sem solo (Tabela 5). Esses resultados estão de acordo com Coraspe et al. (1993), que não observaram diferença significativa na avaliação do teste frio entre sementes nuas e recobertas de alface.

Tabela 5. Teste frio sem solo de sementes de milho UENF 506-6 nuas e recobertas

Tratamentos	Médias
Controle	96,4 a
Meio	96,4 a
Meio + AH	96,6 a
Meio + Bactéria	94,2 a
Meio + AH + Bact.	94,1 a

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se também uma redução no vigor das sementes avaliadas pelo teste frio durante o armazenamento (Figura 5).

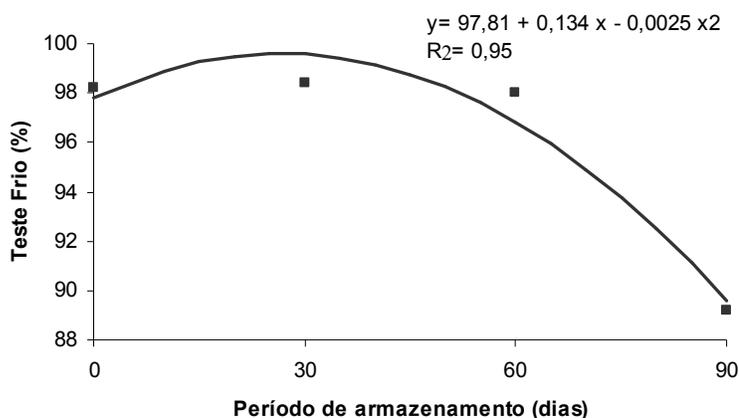


Figura 5. Teste frio de sementes de milho UENF 506-6 durante o armazenamento.

Na avaliação do número de bactérias não foi observada diferença significativa para o ambiente de armazenamento.

Na Figura 6 encontram-se os resultados da avaliação do crescimento bacteriano resultantes da avaliação através da técnica do NMP. A presença de bactérias nos tratamentos com sementes nuas, meio e meio + AH, no tempo 0, provavelmente, foi devido à contaminação durante o processo de recobrimento

das sementes pelas bactérias inoculadas nos tratamentos onde houve inoculação de bactérias, contaminação natural por bactérias diazotróficas presentes nas sementes, na água ou no ambiente em que se encontravam estas plantas. A detecção de bactérias em plantas onde não houve a inoculação de bactérias nas análises de NMP é comum, visto que os meios utilizados durante a técnica e para o recobrimento das sementes são semi-seletivos (Canuto et al., 2003).

Aos 30, 60 e 90 dias não foi observada a presença de bactérias nesses tratamentos (Figura 6), possivelmente o número de bactérias provenientes de uma contaminação durante o recobrimento nesses tratamentos diminuiu com o tempo, e assim não foi possível detectar a presença das bactérias pela técnica do NMP.

Os tratamentos meio+bactérias e meio+bactérias+AH, no tempo 0, mostraram um número superior de bactérias em relação aos demais tratamentos (Figura 6), mostrando que a inoculação das bactérias pelo recobrimento de sementes foi eficiente.

Nos tratamentos onde foi realizada a inoculação de bactérias pelo recobrimento de sementes foi detectada a presença das células bacterianas nas raízes das plântulas oriundas de sementes armazenadas por até 60 dias, mostrando que a técnica do recobrimento pode manter a sobrevivência das células bacterianas por um período de tempo. Assim, as sementes inoculadas pela técnica do recobrimento não precisam ser semeadas logo após o recobrimento, podendo ser armazenadas por um período de 60 dias.

A presença dos AH no recobrimento não alterou o tempo de sobrevivência das bactérias no recobrimento das sementes. Segundo Marques Júnior (2006), os AH podem atuar no aumento da população de bactérias diazotróficas endofíticas, atuando como condicionador físico-químico, bem como promovendo aumento do estabelecimento do inóculo bacteriano no interior da planta. Entretanto, o mesmo autor, verificou que em todas as concentrações de AH avaliadas houve um mesmo padrão de sobrevivência das bactérias em relação ao controle (inoculação de bactérias sem a presença de AH).

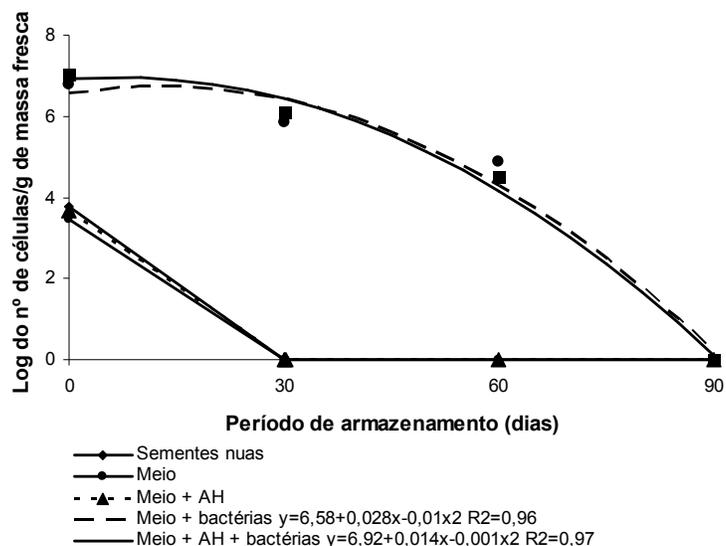


Figura 6. Contagem do número de bactérias diazotróficas (expresso em log do número de células por grama de tecido fresco) em raízes de plântulas de milho UENF 506-8 oriundas de sementes nuas e recobertas.

O recobrimento de sementes mostrou bom desempenho como inoculante de bactérias diazotróficas endofíticas da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), mantendo a viabilidade das células bacterianas ao longo do tempo.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho foi desenvolvido objetivando-se avaliar o período de sobrevivência das células bacterianas no recobrimento, a qualidade fisiológica das sementes recobertas e o efeito da presença dos AH na sobrevivência das bactérias no recobrimento das sementes ao longo do tempo.

O recobrimento das sementes não alterou a perda de qualidade fisiológica das sementes em relação às sementes nuas durante o armazenamento.

Dentre as condições de armazenamento estudadas, a mais adequada para a manutenção da qualidade fisiológica das sementes foi o ambiente de laboratório.

Nos tratamentos onde foi realizada a inoculação de bactérias pelo recobrimento de sementes foi detectada a presença das células bacterianas nas raízes das plântulas oriundas de sementes armazenadas por até 60 dias.

A presença dos AH não alterou a sobrevivência das células bacterianas no recobrimento das sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. (1997). Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, p. 987-991.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.36, p.86-93.
- BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, v.13, p. 65-73.
- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; RIBEIRO, R. C. L. F. (2002) Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasil. Bot.*, v.25, n.4, p.431-439.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para análise de sementes*. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. (2004). Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V., *Tecnologias de Produção do milho*. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 139-182.

- CANUTO, E. L. *Seleção de Bactérias Diazotróficas Endofíticas para Uso com Insumo Biológico em Plantas de Cana-de-açúcar oriundas de sementes.* (2003) Tese (Mestrado em Agronomia) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 72 p.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (2000) Vigor de sementes. *In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (Eds) Sementes: ciência, tecnologia e produção.* Funep, Jaboticabal, p. 224-242.
- CISNEIROS, R. A.; MATOS, V. P.; LEMOS, M. A.; REIS, O. V.; QUEIROZ, R. M. (2003) Qualidade fisiológica de sementes de araçazeiro durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.7, n.3, p.513-518.
- COELHO, M. A. O. (2001). *Atividade da nitrato redutase, composição mineral e caracteres da planta de trigo associados à aplicação de molibdênio, à peletização e à inoculação das sementes com Azospirillum brasilense.* Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 149p.
- CORASPE, H. M.; IDIARTE, G.; MINAMI, K. (1993) Avaliação do efeito da peletização sobre o vigor de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.50, n.3, p. 349 - 354.
- COSTA, C. E. L.; SILVA, R. F.; LIMA, J. O. G.; ARAÚJO, E. F. (2001) Sementes de cenoura, *Daucus carota* L., revestidas e peliculadas: germinação e vigor durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, v.26, p. 36-45.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. (1995) *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.* Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí-RJ. EMBRAPA-CNPAB, 60p.

- DUFFUS, C.; SLAUGHTER, C. (1980) *Seed and their uses*. Avon: John Wiley & Sons, 154 p.
- FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. (2003) Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Agronomia*, v.37, n.2, p. 06-12.
- FREITAS, G. B.; SILVA, R. F.; ARAÚJO, E. F. (1992) Influência da condição de armazenamento na qualidade de sementes de milho. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, MG. v.17, n.1, p.21-26.
- GIMÉNEZ-SAMPAIO, T.; SAMPAIO, N. V. (1994). Recobrimento de sementes. *Informativo ABRATES*, v.4, n.3, p. 52.
- KENNEDY, I. R.; GERK-PEREG, L. L.; WOOD, C.; DEAKER, R.; GILCHRIST, K.; KATUPITIYA, S. (1997) Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil*, v.194, p.65-79.
- MARCOS FILHO, J. (2005) Deterioração de sementes. *In*: MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas* Piracicaba: Fealq, p. 291 - 352.
- MARQUES JÚNIOR, R. B (2006). *Potencial do uso combinado de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas para bioestimulação de plantas*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 88p.
- MENDONÇA, E. A. F. (2003). *Revestimento de sementes de milho superdoce*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Jaboticabal – SP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do campus de Jaboticabal - UNESP, 63p.

OLIVEIRA, J. A.; PEREIRA, C. E.; GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, A. R.; SILVA, J. B. C. (2003a). Desempenho de sementes de pimentão revestidas com diferentes materiais. *Revista Brasileira de Sementes*, v.25, n.2, p.36-47.

OLIVEIRA, J. A.; PEREIRA, C. E.; GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, A. R.; SILVA, J. B. C. (2003b). Efeito de diferentes materiais de peletização na deterioração de sementes de tomate durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v.25, n.2, p.20-27.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri Tipo B. *Suma Phytopathologica*, v.12, p.16.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito do recobrimento de sementes de milho UENF 506-8 com ácidos húmicos (AH), bactérias diazotróficas endofíticas e uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas na estimulação do crescimento vegetal. Para isso, avaliou-se a porcentagem de cimentante a ser utilizada no recobrimento das sementes; a estimulação do crescimento de plantas oriundas de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso conjunto de bactérias e AH; o período de sobrevivência das células bacterianas no recobrimento e a qualidade fisiológica das sementes recobertas armazenadas.

Os experimentos foram realizados no Setor de Produção e Tecnologia de Sementes do Laboratório de Fitotecnia e em casa de vegetação, ambos pertencentes ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes – RJ.

Utilizou-se sementes de milho híbrido UENF 506-8 e a estirpe *H. seropedicae* Z67 BR 11175, isolada obtida de raízes de arroz, proveniente da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica, RJ. O AH, cedido pelo Laboratório de Solos do CCTA/UENF, isolado de vermicomposto.

Entre as porcentagens de cimentante avaliadas, recomenda-se a utilização de 2% de cimentante para a semeadura manual e para a semeadura mecanizada 4 %.

Nas avaliações da estimulação do crescimento vegetal realizadas em Laboratório, a adição de AH, bactéria e o uso combinado de bactérias e AH estimularam o crescimento vegetal.

No experimento em casa de vegetação, com areia, foi observado que o uso conjunto de bactérias e AH + AH irrigado estimulou o crescimento vegetal em relação ao controle. Na mistura terra + areia, a inoculação das bactérias de maneira isolada aumentou o crescimento das plantas em relação ao controle.

Os resultados mostrados nesse trabalho revelaram que os AH utilizados no recobrimento de sementes tem sua capacidade de estimulação do crescimento radicular diminuído, comparado ao uso em solução. Assim, serão necessárias avaliações com diferentes concentrações de AH adicionadas ao recobrimento.

O recobrimento das sementes não alterou a perda de qualidade fisiológica das sementes em relação às sementes nuas durante o armazenamento.

Nos tratamentos onde foi realizada a inoculação de bactérias pelo recobrimento de sementes foi detectada a presença das células bacterianas nas raízes das plântulas oriundas de sementes armazenadas por até 60 dias.

A presença dos AH não alterou a sobrevivência das células bacterianas no recobrimento das sementes.

O recobrimento de sementes mostrou-se como uma nova opção de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) BR 11175.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. (1997). Comportamento de armazenamento de sementes de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, p. 987-991.
- ARANCON, N. Q.; LEE, EDWARDS, C. A.; ATIYEH, R. (2003) Effects of humic acids derived from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants. *Pedobiologia*, 47, p. 741–744.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.36, p.86-93.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v.29, p.911-922.
- BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, v.13, p. 65-73.

- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; RIBEIRO, R. C. L. F. (2002) Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasil. Bot.*, v.25, n.4, p.431-439.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, v.24, p.7-11.
- BINNECK, E.; BARROS, A. C. S. A.; VAHL, L. C. (1999). Peletização e aplicação de molibdênio em sementes de trevo-branco. *Revista Brasileira de Sementes*, v.21, n.2, p.203-207.
- BODDEY, R. M. (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, v.174, p. 195-209.
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. (1988) Nitrogen fixation associated with grasses and cereal : recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.108, p. 53-65.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ASSIS, R. L.; DÖBEREINER, J. (1992) Fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas à cana-de-açúcar. *Comunicado Técnico*, nº 6, p. 1 -5.
- BOUMA, T. J.; NIELSEN, K. L.; KOUTSTAAL, B. (2000) Sample preparation and scanning protocol computer analysis of root length and diameter. *Plant and soil*, v.218, p. 185-196
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para análise de sementes*. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

- CANELLAS, L. P.; OLIVEIRAS, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; FAÇANHA, A. R. (2002). Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiology*, v.130, p. 1951–1957.
- CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.; RUMJANEK, V. M.; MORAES, A. A.; GURIDI, F. (2001). Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1529-1538.
- CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; MÉDICI, L. O.; PERES, L. E. P.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. (2005) Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. In: CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. *HUMOSFERA. Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes – RJ, p. 224 – 243.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. (2004). Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V., *Tecnologias de Produção do milho*. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 139-182.
- CANUTO, E. L.; SALLES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. (2003) Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia*, v.37, n.2, p. 67 - 72.
- CARIARI, M. F.; MARCOS FILHO, J. (1990) Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.). *Revista Brasileira de Sementes*. Brasília, v.12, n.3, p. 52-75.
- CARLONE, M. R.; RUSSEL, W. A. (1987) Response to plant densities and nitrogen levels for maize cultivars from different eras of breeding. *Crop Science*, v.27, n.2, p.465-470.

- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (2000) Vigor de sementes. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (Eds) *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Funep, Jaboticabal, p. 224-242.
- CERIGIOLI, M. M.. (2006). *Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (Zea Mays L.) e potencial para promoção de crescimento*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos, 132 p.
- CHEN, Y.; AVAID, T. (1990). Effects of humic substances on plant growth. In: MACCARTHY, P.; CLAPP, C. E. MALCOM, R. L.; BLOOM, P. R.(Eds) *Humic substances in soils and Crop Science: Selected Readings*, Madison. *Soil Science Society of America*, p. 161-186.
- CISNEIROS, R. A.; MATOS, V. P.; LEMOS, M. A.; REIS, O. V.; QUEIROZ, R. M. (2003) Qualidade fisiológica de sementes de araçazeiro durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.7, n.3, p.513-518.
- COELHO, M. A. O. (2001). *Atividade da nitrato redutase, composição mineral e caracteres da planta de trigo associados à aplicação de molibdênio, à pelletização e à inoculação das sementes com Azospirillum brasilense*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 149p.
- CORASPE, H. M.; IDIARTE, G.; MINAMI, K. (1993) Avaliação do efeito da pelletização sobre o vigor de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.50, n.3, p. 349 – 354.
- COSGROVE, D. J. Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. (1997) *Plant Cell*, v.9, p.1031-1041.

- COSTA, C. E. L.; SILVA, R. F.; LIMA, J. O. G.; ARAÚJO, E. F. (2001) Sementes de cenoura, *Daucus carota* L., revestidas e peliculadas: germinação e vigor durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, (26): 36-45.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. (1995) *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí-RJ. EMBRAPA-CNPAB, 60p.
- DUFFUS, C.; SLAUGHTER, C. (1980) *Seed and their uses*. Avon: John Wiley & Sons, 154 p.
- DUIJFF, B.; GIANINIZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. (1997) Involvement of the outer membrane lipopoly saccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WC417r. *New Phytology*, Oxford, v.135, p.325-334.
- EMBRAPA-CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOLOS (1999) *Sistema Brasileiro de classificação de solos*. Rio de Janeiro: Embrapa. 412 p.
- FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A. L. O.; OLIVARES, F. L.; GURIDI, F.; SANTOS, G. A.; VELLOSO, A. C. X.; RUMJANEK, V. M.; BRASIL, F.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M. A.; CANELLAS, L. P. (2002). Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.37, n.9, p. 1301-1310.
- FERREIRA, F. P. (2002) *Promoção do crescimento de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (Híbridos interespecíficos de Saccharum) por bactérias diazotróficas endofíticas*. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 68p.

- FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. (2003) Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Agronomia*, v.37, n.2, p. 06-12.
- FRANZIN, S. M.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D. C.; ROVERS, T. (2004) Avaliação do vigor de sementes de alface nuas e peletizadas. *Revista Brasileira de Sementes*, v.26, n.2, p. 114-118.
- FREITAS, G. B.; SILVA, R. F.; ARAÚJO, E. F. (1992) Influência da condição de armazenamento na qualidade de sementes de milho. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, MG. v.17, n.1, p.21-26.
- FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. (1988) Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas. *Boletim Técnico* n.121, Instituto Agrônomo, 34 p.
- GIMÉNEZ-SAMPAIO, T.; SAMPAIO, N. V. (1994). Recobrimento de sementes. *Informativo ABRATES*, v.4, n.3, p. 52.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. (2003) Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. *Agronomia*, v.37, n.2, p. 25 – 30.
- HATHCOCK, A. L.; DERNOEDEN, P. H.; TURNER, T. R.; MCINTOSH, M. S. (1984). Tall Fescue and Kentucky Bluegrass Response to Fertilizer and Lime Seed Coatings. *Agronomy Journal*, v.76, p. 879-883.
- KANASHIRO, M.; KAGEYAMA, P. Y.; MÁRQUEZ, F. C. M. (1978). Peletização de sementes de *Eucalyptus* spp. *Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF)*, Piracicaba, v.17, p. 67-73.

- KENNEDY, I. R.; GERK-PEREG, L. L.; WOOD, C.; DEAKER, R.; GILCHRIST, K.; KATUPITIYA, S. (1997) Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil*, v.194, p.65-79.
- KONONOVA, M. M. (1982) *Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona, Oikos-Tau. 364p.
- MAGALHÃES, P. C.; FERREIRA, D. M. N.; VASCONCELOS, C. A.; AZEVEDO, J. T.; BORBA, C. S. (1994). Efeito da peletização na germinação e desenvolvimento de cultivares de sorgo. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.16, n.1, p.20-25.
- MAGUIRE, J. D. (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for emergence and vigour. *Crop Science*, Madison, v.2, n.2, p. 176-177.
- MARCOS FILHO, J. (2005) Deterioração de sementes. In: MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: Fealq, p. 291 - 352.
- MARQUES JÚNIOR, R. B (2006). *Potencial do uso combinado de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas para bioestimulação de plantas*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 88p.
- MARQUES JÚNIOR, R. B.; SILVA, L. G.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. (2007) Promoção do enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas (prelo *Pesquisa Agropecuária Brasileira*).
- MAUREL, C.; CHRISPEELS, M. J. (2001) Aquaporins, A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*, v.125, p. 135-138.

- MEDEIROS, E. M.; BAUDET, L.; PERES, W. B.; EICHOLZ, E. D. (2004) Modificações na condição física das sementes de cenoura em equipamento de recobrimento. *Revista Brasileira de Sementes*, v.26, n.2, p.70-75.
- MENDONÇA, E. A. F. (2003). *Revestimento de sementes de milho superdoce*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Jaboticabal – SP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do campus de Jaboticabal - UNESP, 63p.
- MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LAFIT, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*. v.237, p. 47-54.
- MUSCOLO, A.; CUTRUPI, S.; NARDI, S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.30, p. 1199-1201.
- NORRIS, D. O.; LOPES, E. S.; WEBER, D. F. (1970). Incorporação de matéria orgânica (“mulching”) e aplicação de péletes de calcário (“pelleting”) para testar estirpes de *Rhizobium* em experimentos de campo sob condições tropicais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. n.5, p.125-128.
- OLIVARES, F. L.; FERREIRA, F. P.; SILVA, L. G.; FAÇANHA, A. R.; RAMOS, A. C.; NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, V. M.; MIGUENS, F. C. (2002) Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction symposium on nitrogen fixation with non-legumes, Leuven: *Book of abstracts of 9th international Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes*, p. 38.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. (2003a) Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. *Documento 161*, Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ. 40p.

- OLIVEIRA, J. A.; PEREIRA, C. E.; GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, A. R.; SILVA, J. B. C. (2003b). Desempenho de sementes de pimentão revestidas com diferentes materiais. *Revista Brasileira de Sementes*, v.25, n.2, p.36-47.
- OLIVEIRA, J. A.; PEREIRA, C. E.; GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, A. R.; SILVA, J. B. C. (2003). Efeito de diferentes materiais de peletização na deterioração de sementes de tomate durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v.25, n.2, p.20-27.
- PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A. (2003) Qualidade Fisiológica e Sanitária de sementes de *Brachiaria decumbens* revestidas e tratadas com inseticida e fungicida. *Informativo Abrates*, v.13, n.3, p. 227 (resumo 331).
- PERIN, L.; SILVA, M. F.; FERREIRA, J. S.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. (2003) Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. *Agronomia*, v.37, n.2, p.47-53.
- PICCOLO, A. (2001) The Supramolecular Structure of Humic Substances. *Soil Science*, v.166, n.11, p. 810-832.
- PINTON, R., CESCO, S., IACOLETTI, G., ASTOLFI, S., VARANINI, Z. (1999). Modulation of nitrate uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant and Soil*, v.215, 155-163.
- PIRES, L. L.; BRAGANTINI, C.; COSTA, J. L. S. (2004). Armazenamento de sementes de feijão revestidas com polímeros e tratadas com fungicidas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.7, p. 709-715.
- PRADELLA, D. Z. A.; POMPÉIA, S. L.; MARTINS, S. E.; DINIZ, K. M.; PRADELLA, J. G. C. (1989). Peletização de sementes em gel hidrofílico. *Revista Brasileira de sementes*, 11 (1,2,3), p.43-52.

- RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. (2004). Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.10, p.987-994.
- RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. (1992) The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive and Well. *Plant Physiology*, v.99, 1271-1274
- REZENDE, A. A.; DAVIDE, A. C.; TONETTI, O. A. O. (2005). Estudo da influência da peletização sobre a germinação de sementes de candeia (*Eremanthus Incanus*). *XIV Congresso Brasileiro de Sementes*, v. 15, nos. 1, 2, 3, Foz do Iguaçu, RS, Informativo Abrates.
- RODDA, M. R. C.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R.; ZANDONADI, D. B.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. A.; SANTOS, G. A. (2006) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, p. 649-656.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri Tipo B. *Suma Phytopathologica*, v.12, p.16.
- ROESCH, L. F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P. (2005) Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.4, p. 924-927.
- SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. (1998a). Metodologia para avaliação de materiais cimentantes para peletização de sementes. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.16, n.1, p.31 – 37.
- SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. (1998b) Metodologia para avaliação da resistência de péletes. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.16, n.2, p. 118-122.

- SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. (1998c). Confecção e avaliação de péletes de sementes de alface. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.16, n.2, p.151 – 158.
- SILVA, J. B. C.; SANTOS, P. E. C; NASCIMENTO, W. M. (2002). Desempenho de sementes peletizadas de alface em função do material cimentante e da temperatura de secagem dos péletes. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.20, n.1, p. 67-70.
- SIMPSON, A. J. (2002) Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organica matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.40, p. 572-582.
- SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J.; KINGERY, W. L.; LEFEBVRE, B. A.; MOSER, A.; WILLIANS, A. J.; KVASHA, M.; KELLEHER, B. P. (2006) The application of H High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR for the Study of Clay-Organic Associations in Natural and Synthetic Complexes. *Langmuir*, v. 22, p. 4498-4503.
- SZABÓ, L. P. (2004) Characterization of alginite humic acid content, *Desalination*, 163, p.85-91
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004) Assimilação de nutrientes minerais. In: *Fisiologia Vegetal*. 3ª edição; Porto Alegre, p. 285-307.
- TOMIC, F. (1976) The effect of irrigation and seed pelleting on carrot yields. *Horticultural Abstracts*, London, v.47, n.4, ref. 3731.
- VASCONCELOS, S. S. *Métodos de avaliação da tolerância à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz (Oryza sativa L.)* (1997) Tese (Mestrado em Ciência do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 134 p.

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. In: VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. (eds), *Soil Organic Matter and Biological Activity*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 37-75.

ZANDONADI, D. B. (2006). *Bioatividade de Substâncias Húmicas: Promoção do desenvolvimento radicular e atividade das bombas de H<sup>+</sup>*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 159 p.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DAS PORCENTAGENS DE PERDA DE MATERIAL DE RECOBRIMENTO E DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO RECOBERTAS, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CIMENTANTE.

Quadro 1A. Resumo da análise de variância das porcentagens de perda de material de recobrimento em função da porcentagem de cimentante utilizado no recobrimento de sementes de milho após passarem pela simulação de transporte e semeadura manual

Fontes de Variação	GL	S.Q.	Q.M.
Tratamento	5	27440,14	5488,03*
Resíduo	18	376,8	20,93

(\*) significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 2A. Resumo da análise de variância das porcentagens de perda de material de recobrimento em função da porcentagem de cimentante utilizado no recobrimento de sementes de milho após passarem pela semeadora

Fontes de Variação	GL	S.Q.	Q.M.
Tratamento	5	20643,7	4128,74*
Resíduo	18	610,62	33,92

(\*) significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 3A. Resumo da análise de variância da 1ª contagem do teste de germinação, teste de germinação (TG), teste frio sem solo (TF), emergência em casa de vegetação (Emerg.) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de milho UENF 506-8 nuas e recobertas com 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5% de cimentante

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.				
		1ª Contagem	TG	TF	Emerg.	IVE
Tratamento	3	139,62 <sup>ns</sup>	17,33 <sup>ns</sup>	50,28 <sup>ns</sup>	107,14 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>**</sup>
Resíduo	12	72,00	43,24	39,62	100,00	0,058
CV (%)		10,31	7,22	6,97	10,94	10,11

(<sup>ns</sup>) não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; (<sup>\*\*</sup>) significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

## APÊNDICE B

### RESUMO DAS ANÁLISES REALIZADAS EM PLÂNTULAS ORIUNDAS DE SEMENTES DE MILHO RECOBERTAS COM ADIÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS E INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.

Quadro 1B. Resumo da análise de variância do teste de germinação de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	GL	S.Q.	Q.M.
Tratamento	3	34,37	11,46 <sup>ns</sup>
Resíduo	28	1962,5	70,1
CV (%)			8,84

(<sup>ns</sup>) não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 2B. Resumo da análise de variância da massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) de plântulas de milho oriundas de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.			
		MFPA	MFR	MSPA	MSR
Tratamento	3	0,041*	0,02 <sup>ns</sup>	0,00014 <sup>ns</sup>	0,00009 <sup>ns</sup>
Resíduo	30	0,01	0,008	0,000076	0,0001
CV (%)		19,54	23,11	20,30	25,4

(\* ) significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; (<sup>ns</sup>) não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 3B. Resumo da análise de variância da área radicular (AR) e comprimento radicular (CR) de plântulas de milho recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	
		AR	CR
Tratamento	3	32747463,2 <sup>ns</sup>	20163253 <sup>ns</sup>
Resíduo	30	28870522,1	10274499,8
CV (%)		13,15	53,18

(<sup>ns</sup>) não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 4B. Resumo da análise de variância do número de raízes emergidas (NRE) e número de sítios mitóticos (NSM) de plântulas de milho recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	
		NRE	NSM
Tratamento	3	3918,33*	1265,58 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	456,33	545,08
CV (%)		15,62	41,78

(\*) significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; (<sup>ns</sup>) não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 5B. Resumo da análise de variância do crescimento bacteriano em plântulas de milho recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	GL	S.Q.	Q.M.
Tratamento	3	37,12	12,37**
Resíduo	8	0,87	0,11
CV (%)			6,46

(\*\*) significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 6B. Resumo da análise de variância da massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) de plântulas de milho, crescidas em vasos Leonard, oriundas de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.			
		MFPA	MFR	MSPA	MSR
Tratamento	7	49,22 <sup>ns</sup>	43,25 <sup>ns</sup>	0,3034 <sup>ns</sup>	0,1645 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	32,64	34,63	0,3482	0,1596
CV (%)		20,99	29,8	19,57	26,67

(<sup>ns</sup>) não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 7B. Resumo da análise de variância do crescimento bacteriano em plântulas de milho, crescidas em vasos Leonard, oriundas de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	GL	S.Q.	Q.M.
Tratamento	7	30,82	4,40 (**)
Resíduo	16	4,25	0,265
CV (%)			8,94

(\*\*) significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 8B. Resumo da análise de variância da massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) de plântulas de milho, crescidas em vasos com solo, oriundas de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.			
		MFPA	MFR	MSPA	MSR
Tratamento	3	3,00 <sup>ns</sup>	60,31 <sup>ns</sup>	0,033 <sup>ns</sup>	0,592 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	4,07	32,72	0,057	0,262
CV (%)		28,51	36,42	29,50	40,30

(<sup>ns</sup>) não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 9B. Resumo da análise de variância do crescimento bacteriano em plântulas de milho, crescidas em vasos com solo, oriundas de sementes recobertas com bactérias, AH e o uso combinado de bactérias e AH

Fontes de Variação	GL	S.Q.	Q.M.
Tratamento	3	6,88	2,29 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	21,74	2,72
CV (%)			49,57

(<sup>ns</sup>) não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

## **APÊNDICE C**

**COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DYG's (MODIFICADO), SOLUÇÃO SALINA PARA  
DILUIÇÃO E MEIO DE CULTURA JNFb**

**MEIO DYG's (modificado)**

Glicose.....	2,0g
Ácido Málico.....	2,0g
Peptona bacteriológica.....	1,5g
Extrato de levedura.....	2,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5g
Ácido glutâmico.....	1,5g
Completar com água destilada para 1000 mL	
pH 6,0 p/ <i>Herbapirillum seropedicae</i> ssp.	

**SOLUÇÃO DE SALINA PARA DILUIÇÃO**

1,0 mL.....K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Sol. 10%

0,5 mL..... MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O Sol. 10%

0,2 mL..... NaCl Sol. 10%

0,5 mL..... CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O Sol. 1%

0,5 mL..... .Solução de micronutrientes para meio de cultura

1,0 mL..... FeEDTA Sol. 1,64%

Completar com água destilada para 1000 mL

**MEIO DE CULTURA JNFb**

5 g ..... Ácido Málico

6 mL.....K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Sol. 10%

18 mL.....KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Sol. 10%

2 mL..... MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O Sol. 10%

1 mL..... NaCl Sol. 10%

2 mL..... CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O Sol. 1%

2 mL..... Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH

2 mL..... Solução de micronutrientes para meio de cultura

4 mL..... FeEDTA Sol. 1,64%

4,5 g.....KOH

1 mL..... Vitamina para meio de cultura

Completar com água destilada para 1000 mL.

Ajustar o pH para 5,8 e colocar ágar por último.

Meio de cultura semi-sólido: adicionar 1,9 g de ágar por litro de meio de cultura (dissolver antes da diluição)

## APÊNDICE D

### RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DO TESTE DE GERMINAÇÃO (TG), DA PRIMEIRA CONTAGEM DO TG, DO TESTE FRIO SEM SOLO E DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS DE SEMENTES ARMAZENADAS.

Quadro 1D. Resumo da análise de variância da primeira contagem do TG das sementes de milho UENF 506-6 armazenadas, em função do tratamento, do ambiente e do tempo de armazenamento

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.
Tratamento	4	14506,65	3626,66*
Ambiente	1	385,50	385,50*
Tempo	3	6991,55	2330,52*
Tratamento x Ambiente	4	63,72	15,93
Tratamento x Tempo	12	3006,53	250,54*
Ambiente x Tempo	3	136,19	45,40
Tratamento x Ambiente x Tempo	12	408,55	34,04
Erro	120	4444,84	37,04
CV			7,39

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 2D. Resumo da análise de variância do TG das sementes de milho UENF 506-6 armazenadas, em função do tratamento, do ambiente e do tempo de armazenamento

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.
Tratamento	4	10,48	2,62
Ambiente	1	113,74	113,74*
Tempo	3	1047,59	349,20*
Tratamento x Ambiente	4	38,52	9,63
Tratamento x Tempo	12	173,30	14,44
Ambiente x Tempo	3	54,41	18,14
Tratamento x Ambiente x Tempo	12	189,98	15,83
Erro	120	1600,12	13,33
CV			3,76

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 3D. Resumo da análise de variância do teste frio das sementes de milho UENF 506-6 armazenadas, em função do tratamento, do ambiente e do tempo de armazenamento

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.
Tratamento	4	199,31	49,83*
Ambiente	1	1,44	1,44
Tempo	3	2275,05	758,35*
Tratamento x Ambiente	4	149,94	37,48
Tratamento x Tempo	12	338,15	28,18
Ambiente x Tempo	3	31,21	10,40
Tratamento x Ambiente x Tempo	12	169,64	14,14
Erro	120	1895,13	15,79
CV			4,16

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 4D. Resumo da análise de variância da contagem do número de bactérias (NMP) das sementes de milho UENF 506-6 armazenadas, em função do tratamento, do ambiente e do tempo de armazenamento

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.
Tratamento	4	350,7750	87,6900*
Ambiente	1	0,1320	0,1320
Tempo	3	374,3008	124,7669*
Tratamento x Ambiente	4	0,2107	0,0527
Tratamento x Tempo	12	144,5161	12,0430*
Ambiente x Tempo	3	0,2664	0,0888
Tratamento x Ambiente x Tempo	12	0,4236	0,0353
Erro	80	6,4912	0,0811
CV			12,35

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.