

SUMÁRIO V.1, N2, 2002

PREHARVEST SPRAYING WITH THIDIAZURON REDUCES CALCIUM CONTENT AND INCREASES THE CALIX-END OPENING AND THE INCIDENCE OF MOLDY CORE ON APPLE FRUITS

A PULVERIZAÇÃO PRÉ-COLHEITA COM TIDIAZURON REDUZ O TEOR DE CÁLCIO E AUMENTA A ABERTURA CARPELAR E A INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO CARPELAR EM FRUTOS DE MAÇÃ

Cassandro Vidal Talamini do Amarante, Luiz Eduardo Bassay Blum, Paulo Roberto Ernani, Clarice Aparecida Megguer, Juliana Golin Krammes, Amauri Bogo.....56

SUSTENTABILIDADE DO COLMO EM HÍBRIDOS DE MILHO DE DIFERENTES ÉPOCAS DE CULTIVO EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PLANTAS

MAIZE STALK SUSTAINABILITY IN MAIZE HYBRIDS FROM DIFFERENT ERAS AS AFFECTED BY PLANT DENSITY

Luís Sangoi, Milton Luiz de Almeida, Marcos Antônio Gracietti, Paula Bianchet, Delson Horn.....63

SOBRESSEMEADURA DO CORNICHÃO (*Lotus corniculatus* L.) cv. SÃO GABRIEL EM PASTAGEM NATURAL – DIFERIMENTO E ADUBAÇÃO

*SOD-SEEDING OF BIRDSFOOT TREFOIL (*Lotus corniculatus* L.) cv. SÃO GABRIEL ON NATURAL PASTURE – DEFERMENT AND FERTILIZATION*

Nelson Eduardo Prestes; Aino Victor Ávila Jacques.....73

DESEMPENHO DE DOIS TIPOS DE CORTADORAS-ARRANCADORAS DE FEIJÃO

PERFORMANCE EVALUATION OF TWO BEAN HARVESTERS

Alberto Kazushi Nagaoka, Peter John Martyn, Haroldo Carlos Fernandes, Roberto Kazuhiko Zito, Paulo Roberto Cecon.....82

ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FASES SÓLIDA E LÍQUIDA DE UM SOLO ÁCIDO PELA APLICAÇÃO DE CALCÁRIO E GESSO AGRÍCOLA

ALTERATION ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE SOLID AND LIQUID PHASES OF AN ACID SOIL BY LIME AND GYPSUM APPLICATION

Hatila Julião de Oliveira, Paulo Roberto Ernani, Cassandro Vidal Talamini do Amarante.....93

RELAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO NA INFECÇÃO DE SEMENTES DE PIMENTÃO POR *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, CAUSADORA DO CANCRO BACTERIANO

RELATIONSHIP BETWEEN INOCULATION METHODS ON SWEET PEPPER'S SEEDS INFECTION BY Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis CAUSED BY BACTERIAL CANKER

Amauri Bogo, Armando Takatsu, Mari Inês C. Boff, Cassandro V. T. do Amarante.....102

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS COM A UTILIZAÇÃO DE MICROPIPETAS DE VIDRO OU PALHETAS ESTIRADAS
BOVINE OOCYTE VITRIFICATION WITH GLASS MICROPIPETES OR OPEN PULLED STRAW

Alceu Mezzalira, Arnaldo Diniz Vieira, Fabiano Buss Cruz, Dilmar Paulo Barbieri, Juliana Cardoso Damiani.....108

CONGELAMENTO ULTRA – RÁPIDO DE EMBRIÕES BOVINOS
ULTRA-RAPID FREEZING OF BOVINE EMBRYOS

Alceu Mezzalira, Arnaldo Diniz Vieira, Luiz Fernando Assis da Silva, Valter Yoshiharu Kajiyama.....115

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE BRUCELLA OVIS

COMPARISON OF ANTIGENS USED FOR THE DIAGNOSIS OF BRUCELLA OVIS

Priscilla Karina Vitor Koerich, Adil Knackfuss Vaz.....120

PREHARVEST SPRAYING WITH THIDIAZURON REDUCES CALCIUM CONTENT AND INCREASES THE CALIX-END OPENING AND THE INCIDENCE OF MOLDY CORE ON APPLE FRUITS

A PULVERIZAÇÃO PRÉ-COLHEITA COM TIDIAZURON REDUZ O TEOR DE CÁLCIO E AUMENTA A ABERTURA CARPELAR E A INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO CARPELAR EM FRUTOS DE MAÇÃ

Cassandro Vidal Talamini do Amarante¹; Luiz Eduardo Bassay Blum²; Paulo Roberto Ernani¹; Clarice Aparecida Megguer³; Juliana Golin Krammes³; Amauri Bogo¹

SUMMARY

Thidiazuron (TDZ; N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylureia) is a substituted phenylurea that shows strong cytokinin-like activity in plant tissues. The product is sprayed at full bloom on apple trees to increase fruit set and improve fruit growth. Besides affecting tree physiology and fruit size, TDZ might influence other aspects related to fruit quality. Treated plants normally bear malformed fruits with a more protruded distal end. This work was carried out to investigate the effects of TDZ on fruit carpel aperture, fruit shape, seed number, fruit calcium content, and moldy core (caused by several pathogens) of apples. Apple trees, cultivars Gala and Fuji, were sprayed at full bloom with TDZ at doses of 0, 5, 10, or 20 g (a.i) ha⁻¹. TDZ caused fruit malformation and an increment of carpel aperture, reduced the concentration of calcium in the fruit skin, and increased the incidence of moldy core in 'Gala' (from 0 to 4%) and in 'Fuji' (from 29 to 42%). The increase of moldy core by TDZ in apples may be related to decreases on fruit calcium content and increases on carpel aperture.

KEY WORDS: *Malus domestica* Borkh., cytokinin, diphenylurea derivative, nutrition, core

rot, fruit quality.

RESUMO

O tidiazuron (TDZ; N-phenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ilureia) é uma feniluréia substituída que apresenta forte ação citocinínica em tecidos de plantas. O produto é pulverizado em macieiras na plena floração para aumentar a frutificação efetiva e promover crescimento de frutos. Além de afetar a fisiologia das plantas e crescimento de frutos, o TDZ interfere em outros aspectos relacionados com a qualidade dos frutos. As plantas tratadas normalmente apresentam frutos deformados, com a parte distal protrusa. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos do TDZ na abertura carpelar, no formato dos frutos, no número de sementes, nos teores de cálcio e na incidência de podridão carpelar (causada por diversos patógenos) em maçãs. Macieiras, cultivares Gala e Fuji, foram pulverizadas na plena floração com TDZ nas doses de 0, 5, 10 e 20 g (i.a.) ha⁻¹. O TDZ ocasionou deformação e aumento na abertura carpelar, reduziu a concentração de cálcio na película e aumentou a incidência de podridão carpelar em 'Gala' (de 0 para 4%) e 'Fuji' (de 29 para 42%). O aumento na incidência de podridão carpelar em macieiras pulverizadas com TDZ pode estar relacionado à redução nos teores de cálcio e o aumento na abertura carpelar nos frutos.

PALAVRAS-CHAVE: *Malus domestica* Borkh., citocinina, feniluréia substituída, nutrição, podridões, qualidade de fruto.

INTRODUCTION

¹ Ph.D., Professor da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Cx. Postal 281, Lages, SC, CEP 88.502-970. E-mail: amarante@cav.udesc.br.

² Ph.D., Professor da Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Campus Universitário, Asa Norte, Brasília, DF, CEP 70910-900. E-mail: luizblum@unb.br.

³ Bolsista de Iniciação Científica do CNPq, Acadêmica do Curso de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Cx. Postal 281, Lages, SC, CEP 88.502-970.

Plant growth regulators have been used to improve fruit set and fruit growth in temperate fruit trees (ELFVING & CLINE, 1993; FAMIANI et al., 1999; GREENE, 1995). Cell division and elongation, which affect the final fruit size, are promoted by the growth substances auxin, cytokinin, and gibberellin (TAIZ & ZAIGER, 1998). A synthetic substituted phenylurea, thidiazuron (TDZ; N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea), shows cytokinin-like activity in plant tissues (ELFVING & CLINE, 1993; GREENE, 1995) and strong fruit growth promoting effect in apple, kiwifruit, grape, and persimmon (ELFVING & CLINE, 1993; FAMIANI et al., 1999; GREENE, 1995; ITAI et al., 1995; PETRI et al., 2001; REYNOLDS et al., 1992; SCHUCK & PETRI, 1992). GREENE (1995) reported increases in fruit weight greater than 30% for 'McIntosh' and 'Empire' apples sprayed at full bloom with TDZ at doses of 50 mg L⁻¹ and 15 mg L⁻¹, respectively.

However, on apples, treatments with TDZ might affect vegetative growth, flowering behavior, and mineral content of leaves and fruits, depending on product concentration, time of application, and cultivar (ELFVING & CLINE, 1993; GREENE, 1995). ELFVING & CLINE (1993) reported higher K and lower N, Ca, and Mg contents in the leaves of 'Empire' apples sprayed with TDZ at full bloom at doses of 65 and 125 mg L⁻¹. TDZ effects on fruit-flesh nutrient concentration were associated with higher content of K and slightly lower content of Ca. However, the authors did not assess the incidence of decay and physiological disorders and postharvest quality of the fruit. GREENE (1995) reported a small increase of bitter pit incidence at harvest when apple trees were sprayed 18 days after full bloom with 15 mg L⁻¹ of TDZ.

Besides affecting tree physiology and fruit growth, TDZ also influences other aspects of fruit quality. The chemical increased the fruit length : diameter (L : D) ratio in apple (GREENE, 1995) and reduced it in kiwifruit

(FAMIANI et al., 1999). TDZ increased the number of malformed fruit in apple (GREENE, 1995) and the number of fruit with distal protuberance in kiwifruit (FAMIANI et al., 1999; SCHUCK & PETRI, 1992). At doses of 10 or 50 mg L⁻¹, TDZ reduced seed count in 'McIntosh' apples (GREENE, 1995). On apples, the product also delayed fruit maturity and ripening (FAMIANI et al., 1999; GREENE, 1995; ITAI et al., 1995; MEGGUER et al., 2001; PETRI et al., 2001; REYNOLDS et al., 1992).

On apples, TDZ sprayed at full bloom to increase fruit set also increased the incidence of moldy core (MEGGUER et al., 2001). Moldy core, also called core rot, is caused by several pathogens, such as, *Alternaria* Ness., *Fusarium* Link., *Penicillium* Link., *Botrytis* Pers., *Phoma* Desm., *Phomopsis* Sacc., *Mucor* Link., *Pestalotia* de Not., *Aspergillus* Link., *Candida* Berkhout., *Cladosporium* Link., *Gloeosporium* Desm. & Mont., *Epicoccus* Link., and *Rhizopus* Corda (JONES & ALDWINCKLE, 1990; BONETI et al., 1999). These fungi infect carpel and core regions of the fruit and cause internal dry or soft rots (JONES & ALDWINCKLE, 1990; BONETI et al., 1999). Apple cultivars with larger carpel aperture are more susceptible to moldy core (SPOTS, 1990). Since apple trees treated with TDZ bear malformed fruits with a more protruded distal end (MEGGUER et al., 2001) and, possibly, a larger carpel aperture, this product might also increase the incidence of moldy core.

Published information shows that TDZ has a diversity of physiological effects on treated plants, which might have substantial impacts on fruit quality. The product effects on fruit shape (with a more protruded distal end) and nutrition (reduced calcium content) might affect fruit susceptibility to decay. In recent years, the increasing concern of apple growers in Southern Brazil with the high losses caused by moldy core might reflect the intensive use of TDZ to improve fruit set and fruit growth. The objective of this work was to evaluate the effects of different doses of TDZ, sprayed at full bloom, on seed

number, calcium content, shape and moldy core of 'Gala' and 'Fuji' apples.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in a commercial orchard in Lages, Santa Catarina State, Southern Brazil, in 1999/2000. Ten-year-old apple trees, cultivars Gala and Fuji, grafted on 'Marubakaido' rootstock, were sprayed at full bloom, with TDZ at doses of 0, 5, 10, or 20 g (a.i.) ha⁻¹, with a total spray volume of 1,000 L ha⁻¹. The trees were treated with a tractor-mounted airblast sprayer. Spray barriers, made of polyethylene mounted on wood poles, were used to prevent spray drift between experimental plots. The experiment followed a completely randomized block design with four replicates. Each experimental unity was composed by five rows of eight plants. Only four plants in the center of the middle row had the fruit harvested at commercial maturity and assessed for number of viable seed, calcium content, shape and moldy core.

Ten fruits per plant were collected at commercial harvesting and assessed for calcium content in the skin. The fresh fruit samples were digested with a mixture of sulfuric acid and hydrogen peroxide, as described by ADLER & WILCOX (1985). Calcium was determined with an inductive coupled plasma spectrophotometer (ICP).

Lots of 30 fruit per replicate were selected for count 110-135 and assessed for number of viable seeds per fruit, percentage of asymmetric fruit, carpel aperture (with a caliper), and incidence of moldy core (independent of the pathogen).

All data were subjected to statistical analysis using SAS (1990). Percentage data were transformed to arc sin $[(x+5)/100]^{1/2}$ before being submitted to the ANOVA. The effect of TDZ dose on each attribute assessed was analyzed by orthogonal polynomial contrasts.

RESULTS AND DISCUSSION

Since the experimental area had high presence of bees, and the weather conditions

were favorable for the entomophilic pollination, yield was not affected by TDZ treatments in any cultivar (data not shown). Average fruit weight did not increase with increases on TDZ dose (data not shown), that disagrees with previous published studies, which show substantial increase on fruit size with increases on TDZ doses (FAMIANI et al., 1999; GREENE, 1995; ITAI et al., 1995; PETRI et al., 2001; REYNOLDS et al., 1992). However, those studies were performed mainly by dipping the fruit in a solution of TDZ, or by spraying some trees or some limbs per tree with the product to the drip point. This might result in a much higher dose of TDZ than those applied in our study, where the plants were treated with a tractor-mounted airblast sprayer, as done commercially. This might have reduced the product effectiveness in promoting fruit growth. REYNOLDS et al. (1992) also emphasized the importance of field trials to determine the effective concentration of TDZ when the product is sprayed commercially in grapes to promote fruit growth.

The number of viable seeds per fruit was not affected by TDZ in both cultivars (Table 1), probably due to the use of small doses (up to 20 g ha⁻¹, corresponding to ~20 mg L⁻¹) and the application time (at full bloom). This might also indicate that 'Gala' and 'Fuji' are less prone to seed abortion by TDZ than other cultivars. In addition, since the experimental area had high presence of honeybees, and the weather conditions were favorable for the entomophilic pollination, this might have prevented any effect of TDZ on seed count. The number of seeds per fruit was not also affected by TDZ sprayed at full bloom at the doses of 5 or 10 mg L⁻¹ in 'Double Red Delicious' apples (GREENE, 1995), and at the dose of 20 mg L⁻¹ in kiwifruit (FAMIANI et al., 1999). However, in 'Empire' apples, TDZ sprayed 22 days after full bloom to promote fruit thinning, at doses of 62 or 125 mg L⁻¹, nearly eliminated seed development (ELFVING & CLINE, 1993). Nevertheless, the reduced seed count did not influence fruit shape, fruit size and

fruit-fresh nutrient concentration (N, P, K, Ca, and Mg). At doses of 10 or 50 mg L⁻¹, TDZ reduced seed count in 'McIntosh' apples when the product was sprayed at full bloom or 22 days after full bloom; the highest concentration and latter application caused the greatest reduction of seed count (GREENE, 1995).

TDZ at doses of 10-20 g ha⁻¹ reduced calcium content ~ 17-20% in the fruit skin in both cultivars (Table 1). This might have also increased fruit susceptibility to moldy core infection during fruit growth on the tree. Apples with low calcium content are more susceptible to decay (CONWAY et al., 1999). The reduction of calcium concentration in 'Gala' and 'Fuji' by TDZ was not related to seed abortion. Instead, it might have been the result of an intense growth of vegetative tissues (terminal buds and growing leaves) caused by TDZ that increases calcium accumulation into these organs in detriment of growing fruit (AMARANTE et al., 2002).

TDZ increased fruit L : D ratio (data not shown), caused fruit malformation, increased the carpel aperture and the incidence of moldy core in both cultivars (Table 1). In 'Gala', the percentage of asymmetrical fruit varied from 4% for the control treatment to higher than 50% for TDZ at doses of 10 and 20 g ha⁻¹ (Table 1). In 'Fuji', the percentage of asymmetrical fruit varied from about 30% for the control treatment to about 55% for TDZ at doses higher than 5 g ha⁻¹ (Table 1). These increases indicate that TDZ, by its cytokinin-like effect, affects the direction of cell division or cell expansion resulting in fruit elongation and opening of the carpel aperture of apples (ELFVING & CLINE, 1993; GREENE, 1995). In apple, GREENE (1995) observed increases on fruit malformation with increases of TDZ dose especially when treatments were made later after full bloom (18 days after full bloom). In kiwifruit, high doses of TDZ increased the number of fruit with distal protuberance (FAMIANI et al., 1999; SCHUCK & PETRI, 1992). The asymmetry in fruits treated with phenylureas seems to be the result of extremely limited mobility and redistribution of the product from the application sites, causing uneven fruit growth and misshapen (BIASI et al., 1993). The asymmetry may be overcome by more uniform distribution over the fruit surface, using uniform application of small droplets or multiple sprays at low concentration (BIASI et al., 1993), and by avoiding treatments later after full bloom (GREENE, 1995).

Despite of a lower increase of carpel aperture in 'Fuji' than in 'Gala' with increments of TDZ dose, 'Fuji' had higher incidence of moldy core than 'Gala' (Table 1).

The higher incidence of moldy core in 'Fuji' than in 'Gala' might reflect differences in susceptibility to fungal infection and/or the differences of fruit harvesting dates between these cultivars. 'Fuji' had slightly higher calcium content than 'Gala', but since 'Fuji' is harvested later than 'Gala' and, therefore, exposed to a longer period of fungal infection in the orchard, this might increase the incidence of moldy core in 'Fuji'.

TABLE 1 - Number of viable seeds, concentration of calcium (Ca) in the fruit skin, asymmetrical fruit, carpel aperture, and moldy core (mean \pm SE) of apples from trees sprayed with different doses of thidiazuron (TDZ). The significance of linear and quadratic relationships between doses of TDZ and fruit quality attributes were analyzed by means of polynomial orthogonal contrasts (*, **, and *** for 5, 1, and 0.1 % of significance, respectively; ns: non significant).

TDZ (g ha ⁻¹)	'GALA'					'FUJI'				
	Seeds/ fruit	Ca in the skin (mg kg ⁻¹)	Asymmetrical fruit (%)	Carpel aperture (mm)	Moldy core (%)	Seeds/ fruit	Ca in the skin (mg kg ⁻¹)	Asymmetrical fruit (%)	Carpel aperture (mm)	Moldy core (%)
0	6.1 \pm 0.2	305.4 \pm 20.8	4.2 \pm 2.5	5.4 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	7.2 \pm 0.2	329.7 \pm 3.6	34.2 \pm 4.4	5.0 \pm 0.1	29.2 \pm 1.6
5	5.7 \pm 0.2	257.3 \pm 23.5	30.8 \pm 3.9	6.0 \pm 0.1	1.7 \pm 1.0	7.3 \pm 0.2	284.3 \pm 22.9	55.0 \pm 6.2	5.2 \pm 0.1	35.0 \pm 5.5
10	6.0 \pm 0.2	240.7 \pm 9.3	53.3 \pm 3.6	5.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.8	7.1 \pm 0.2	261.5 \pm 17.8	55.8 \pm 2.8	5.3 \pm 0.1	41.5 \pm 7.8
20	5.9 \pm 0.2	253.5 \pm 10.8	56.7 \pm 8.5	6.8 \pm 0.1	4.2 \pm 1.6	7.3 \pm 0.2	272.2 \pm 11.7	55.0 \pm 6.4	5.3 \pm 0.1	41.7 \pm 5.5
Linear	ns	*	***	***	*	ns	**	*	*	*
Quadratic	ns	*	***	ns	ns	ns	*	*	ns	ns

In conclusion, TDZ increased carpel aperture and reduced fruit calcium content in both apple cultivars. This might contribute to increase fruit susceptibility to moldy core infection during fruit growth on the tree. In recent years, the increasing concern of apple growers in Southern Brazil with the high losses caused by moldy core might reflect the intensive used of TDZ to improve fruit set.

REFERENCES

ADLER, P. R. & WILCOX, G. E. Rapid perchloric acid digestion methods for analysis of major elements in plant tissue. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Athens, v. 16, n. 11, p. 1153-1163, 1985.

AMARANTE, C. V. T. do, ERNANI, P.R., BLUM, L. E. B. et al. Thidiazuron effects on shoot growth, return bloom, fruit set and nutrition os apples. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.10, p.1365-1371, 2002.

BIASI, R., NERI, D., SUGIYAMA, N. et al. ¹⁴C-CCPU uptake and distribution in developing kiwifruits and apples. **Acta Horticulturae, Wageningen**, n. 329, p. 101-104, 1993.

BONETI, J. I. S., RIBEIRO, L. G., KATSURAYAMA, Y. **Manual de Identificação de Doenças e Pragas da Macieira**. Florianópolis: Epagri, 1999. 210 p.

CONWAY, W. S., JANISIEWICZ, W. J., KLEIN, J. D. et al. Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **HortScience**, Alexandria, v. 34, n. 4, p. 700-704, 1999.

ELFVING, D.C. & CLINE, R.A. Cytokinin and ethephon affects crop load, shoot growth, and nutrient concentration of 'Empire' apple trees. **HortScience**, Alexandria, v. 28, n. 10, p. 1011-1014, 1993.

FAMIANI, F., BATTISTELLI, A., MOSCATELLO, S. et al. Thidiazuron affects growth, ripening and quality of *Actinidia deliciosa*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v. 74, n. 3, p. 375-380, 1999.

GREENE, D. W. Thidiazuron effects on fruit set, fruit quality, and return bloom of apples. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 6, p. 1238-1240, 1995.

ITAI, A., TANABE, K., TAMURA, F. et al. Synthetic cytokinins control persimmon fruit shape, size and quality. **Journal of Horticultural Science**, Kent, v. 70, n. 6, p. 867-873, 1995.

JONES, A. L. & ALDWINCKLE, H. S. **Compendium of Apple and Pear Diseases**. St. Paul: APS Press, 1990, 213 p.

MEGGUER, C. A., AMARANTE, C. V. T. do, BLUM, L. E. B. et al. Postharvest physiology and quality of apples is affected by preharvest spraying of thidiazuron. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8, 2001, Ilhéus, BA. **Resumos... Ilhéus**, BA, 2001. p. 138.

PETRI, J. L., SCHUCK, E., LEITE, G. B. Efeito do thidiazuron (TDZ) na frutificação de fruteiras de clima temperado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 513-517, 2001.

REYNOLDS, A. G., WARDLE, D. A., ZUROWSKI, C. et al. Phenylureas CPPU and thidiazuron affects yield components, fruit composition, and storage potential of four seedless grape selections. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 1, p. 85-89, 1992. SAS. Cary: SAS institute Inc. 1990. 789 p.

SCHUCK, E. & PETRI, J. L. Efeitos do thidiazuron no peso médio dos frutos de quivi.

Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas, v. 14, n. 2, p. 185-188, 1992.

SPOTS, R. A. Moldy core and core rot. In: Jones, A. L. & Aldwinckle, H. S. (Ed). **Compendium of Apple and Pear Diseases**. St. Paul: APS

Press, 1990. p. 29-30.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 1998. 792 p.

SUSTENTABILIDADE DO COLMO EM HÍBRIDOS DE MILHO DE DIFERENTES ÉPOCAS DE CULTIVO EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PLANTAS

MAIZE STALK SUSTAINABILITY IN MAIZE HYBRIDS FROM DIFFERENT ERAS AS AFFECTED BY PLANT DENSITY

Luís Sangoi¹; Milton Luiz de Almeida²; Marcos Antônio Gracietti³; Paula Bianchet³, Delson Horn⁴

RESUMO

O incremento na densidade de plantas aumenta a interceptação da radiação solar pela cultura do milho. Contudo, ele também estimula o estiolamento, favorecendo o acamamento e quebra de colmos. Este trabalho foi conduzido objetivando avaliar os efeitos da densidade populacional sobre a arquitetura de planta, sustentabilidade do colmo e rendimento de grãos de híbridos de milho cultivados em diferentes épocas. O experimento foi instalado no município de Lages, SC, em 20/10/2000. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, dispostos em parcelas subdivididas. Na parcela principal foram avaliados os híbridos duplos Agroceres 12 (Ag 12), Agroceres 303 (Ag 303) e o híbrido simples DeKalb 929 (DKB 929), liberados comercialmente para cultivo nas décadas de 70, 80 e 90, respectivamente. Nas subparcelas foram testadas quatro populações de planta: 25.000, 50.000, 75.000 e 100.000 pl ha⁻¹. Foram avaliadas características morfológicas, alométricas, percentagem de plantas acamadas e quebradas, bem como o rendimento de grãos das plantas eretas e prostradas de cada subparcela. A densidade de plantas não interferiu sobre a ocorrência do acamamento. O aumento do número de plantas de 25.000 para 100.000 pl ha⁻¹ estimulou maior quebra de colmos dos híbridos Ag 12 e Ag 303, não interferindo sobre a sustentabilidade dos colmos do híbrido DKB 929.

Características como baixa altura relativa

de inserção de espiga e alta homogeneidade no diâmetro do colmo contribuíram para minimizar a quebra de colmos antes da colheita no híbrido DKB 929. A sustentabilidade do colmo é fundamental para que o rendimento potencial de híbridos de milho possa ser devidamente explorado através do aumento na densidade de plantas.

PALAVRAS-CHAVE: *Zea mays*, acamamento, quebra, rendimento de grãos.

SUMMARY

The increment in plant density enhances the radiation interception period by maize. Nonetheless, it also stimulates etiolation, favoring root and stem lodging. This experiment was conducted aiming to evaluate the effects of population density on plant architecture, stalk sustainability and grain yield of maize hybrids from different eras. The experiment was installed in Lages, SC, on 10/20/2000. A split plot design was used. Hybrids Agroceres 12 (Ag 12), Agroceres 303 (Ag 303) and Dekalb 929 (DKB 929), commercially released in the 70's, 80's and 90's, respectively, were tested in the main plots. Plant populations equivalent to 25,000, 50,000, 75,000 and 100,000 pl ha⁻¹ were assessed in the split plots. Morphological and allometric traits, root and stem lodging, grain production of erect and prostrated plants were determined. Plant population density did not affect root lodging. The increase in plant number per hectare from 25,000 to 100,000 stimulated greater stalk lodging for hybrids Ag 12 and Ag 303, but did not interfere with DKB 929 stem sustainability. Traits such as low ear-to-plant height ratio and high stem diameter homogeneity were instrumental to mitigate DKB 929's stalk lodging before

¹ Eng. Agrônomo, Ph.D. – Professor, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV. Av. Luiz de Camões, 2090, 88.520-000. Lages, SC. E-mail: a2ls@cav.udesc.br.

² Eng. Agrônomo, Doutor – Professor, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

³ Acadêmicos do curso de Agronomia CAV/UDESC. - ⁴ Acadêmico do curso de Mestrado em Ciência do Solo CAV/UDESC.

harvesting. Maize stem sustainability is fundamental to properly explore commercial hybrids yield potential through the use of high plant populations.

KEY WORDS: *Zea mays*, lodging, breakage, grain yield

INTRODUÇÃO

O milho é uma das espécies de importância agrícola que apresenta maior potencial de utilização da radiação solar para a conversão de carbono mineral em carbono orgânico e o seu posterior acúmulo nos grãos (SLAFFER & OTEGUI, 2000). Para viabilizar este potencial, há necessidade de maximizar a duração do período de interceptação da radiação incidente (WESTGATE et al., 1997). A eficiência de interceptação desta radiação e sua conversão em fitomassa dependem de fatores climáticos, edáficos e de manejo, destacando-se as práticas culturais que interferem sobre a densidade e o arranjo de plantas (SANGOI, 2001).

O incremento na densidade de plantas e a redução no espaçamento entre-linhas são duas estratégias de manejo que auxiliam a cultura a fechar os espaços disponíveis mais rapidamente, aumentando a eficiência de interceptação da radiação incidente (ARGENTA et al., 2001). Por outro lado, altas densidades de plantas interferem na quantidade e qualidade da radiação que atinge o interior do dossel, aumentando a susceptibilidade da lavoura ao acamamento e quebra de colmos (RAJCAN & SWANTON, 2001).

O incremento da densidade de plantas reduz a disponibilidade de fotoassimilados para o enchimento dos grãos e manutenção das demais estruturas do vegetal (SANGOI et al., 2000). Após a floração, o fluxo de fotoassimilados dentro da planta é direcionado prioritariamente aos grãos. Quando o aparato fotossintético não produz carboidratos em quantidade suficiente para a manutenção de todos os drenos, a maior demanda exercida pelos grãos por estes produtos leva os tecidos da raiz e da base do colmo a senescerem precocemente, fragilizando estas regiões (TOLLENAAR et al., 1994).

Altas densidades de plantas também interferem na qualidade da luz que atinge o interior da comunidade, incrementando a

quantidade de vermelho extremo (VE) e diminuindo a quantidade de vermelho (V) (RAJCAN & SWANTON, 2001). O aumento da relação VE/V altera diversas características morfológicas que interferem na arquitetura de planta, estimulando a dominância apical e a alongação de entre-nós, diminuindo o diâmetro de colmo e suprimindo a produção de afilhos (BALLARÉ & CASSAL, 2000). Estas alterações aumentam a percentagem de plantas acamadas e quebradas.

Os híbridos de milho diferem consideravelmente em diversas características morfológicas, tais como altura de planta, altura de inserção de espiga, número de folhas, comprimento de folha, área e ângulo de inserção foliar (STEWART & DWYER, 1997). Estas diferenças tem efeito pronunciado sobre a interceptação e a atenuação da radiação incidente, afetando a resposta da cultura a variações na população de plantas.

Grande ênfase tem sido dada pelos programas de melhoramento de milho do sul do Brasil ao desenvolvimento de híbridos com baixa exigência calórica para florescer, caracterizados pelo porte baixo, menor número de folhas e pela presença de folhas eretas (ALMEIDA et al., 2000, SANGOI et al., 2002a). Este ideotipo compacto pode contribuir para melhorar a sustentabilidade das plantas ao final do ciclo, em relação aos híbridos cultivados no passado, principalmente quando semeados em alta densidade de planta. Contudo, são escassos os estudos avaliando os efeitos do arranjo de plantas sobre a percentagem de plantas acamadas e quebradas de híbridos representativos de diferentes épocas de cultivo, sob condições edafo-climáticas e de manejo semelhantes (SANGOI et al., 2002b). Tais trabalhos são relevantes, pois genótipos com alto potencial produtivo são freqüentemente rejeitados durante o processo de seleção devido a problemas com sustentabilidade da planta na colheita (HONDROYIANNI et al., 2000).

Este experimento foi conduzido objetivando avaliar o efeito do incremento da população de plantas

sobre o rendimento de grãos e características morfo-fisiológicas ligadas ao acamamento e quebra de colmos, em híbridos de milho cultivados expressivamente no sul do Brasil nas últimas décadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na cidade de Lages durante o ano agrícola de 2000/2001. O local experimental está situado a 27°52' de latitude sul e 50°18' de longitude oeste. O clima da região é classificado por Köppen como Cfb, apresentando verões amenos, invernos rigorosos e precipitação pluvial adequada durante o ano todo. O solo da área experimental é um Nitossolo Vermelho (EMBRAPA, 1999).

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, dispostos em parcelas subdivididas, com três repetições por tratamento. Na parcela principal foram avaliados os híbridos duplos Agrocere 12 (Ag 12), Agrocere 303 (Ag 303), e o híbrido simples Dekalb 929 (DKB 929), liberados comercialmente para cultivo nas décadas de 70, 80 e 90, respectivamente. Os três híbridos testados foram (Ag 12 e Ag 303) ou ainda são (DKB 929) cultivados expressivamente por pelo menos três anos após o seu lançamento no sul do Brasil, apresentando uma exigência calórica para florescimento de 920, 840 e 835 UC, respectivamente. Nas subparcelas foram testadas quatro populações de planta: 25.000, 50.000, 75.000 e 100.000 pl ha⁻¹. Cada subparcela foi composta por seis linhas, com sete metros de comprimento, espaçadas de 75 cm entre si.

O experimento foi instalado manualmente em 20/10/2000, no sistema de semeadura direta, sobre uma cobertura de inverno de aveia preta. As sementes de cada híbrido foram tratadas antes da semeadura com o inseticida thiametoxan, na dose de 40 g de i.a. do produto para cada 100 kg de sementes, visando prevenir o ataque de pragas de solo na fase de semeadura-emergência. Utilizou-se barbantes marcados com as distâncias pertinentes a cada densidade de plantas para posicionar as sementes adequadamente no sulco de semeadura. Aplicou-se à superfície do solo, sobre os sulcos de semeadura, quantidades equivalentes a 30 kg de N, 80 kg de P₂O₅ e 100 kg de K₂O por hectare durante a semeadura. As quantidades aplicadas de nitrogênio, fósforo e potássio foram definidas em função dos valores de reposição sugeridos pela COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO RS-SC (1995) em lavouras de milho com expectativa de rendimento superior a 6.000 kg ha⁻¹.

Uma mistura de atrasina (1.400 g i.a. ha⁻¹) e metolachlor (2.100 g i.a. ha⁻¹) foi aplicada logo após a semeadura para controle de plantas daninhas em pré-emergência. Efetuou-se desbaste para ajustar a densidade aos valores pré-estabelecidos em cada tratamento quando o milho se encontrava com três folhas expandidas. Aplicou-

se 80 kg ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura quando as plantas se encontravam com cinco folhas expandidas. Utilizou-se a uréia como fonte de fertilizante nitrogenado.

Após o desbaste, escolheu-se cinco plantas ao acaso na linha dois de cada subparcela, nas quais marcou-se com tinta não lavável a quarta e a oitava folha totalmente expandidas. Estas plantas foram utilizadas na floração para determinação do número total de folhas por planta, do comprimento de folha, do ponto de inflexão da folha e da área foliar. O comprimento foliar foi avaliado medindo-se a distância do colar até a extremidade da folha índice e de duas folhas acima e abaixo desta. As mesmas folhas foram utilizadas na estimativa do ponto de inflexão da folha (distância entre o colar e o ponto em que a folha iniciou a vergar). A área foliar foi estimada através da expressão $A = C \times L \times 0.75$, em que C e L representam o comprimento e a largura máxima da folha, respectivamente, de acordo com procedimento descrito por TOLLENAAR (1992).

A estatura da planta (EP) e a altura de inserção de espiga (AIE) foram determinadas amostrando-se cinco plantas da área útil quando as mesmas se encontravam no estágio R3 (grão leitoso) da escala de RITCHIE & HANWAY (1993). Com base nestes dois parâmetros, foi calculada a altura relativa da espiga (ARE), através da expressão $ARE = AIE/EP$. As plantas foram mantidas sob condição natural de precipitação durante todo o ciclo da cultura. No dia da colheita do ensaio, amostrou-se, com o auxílio de um paquímetro, cinco plantas para a determinação do diâmetro do colmo no segundo entre-nó expandido acima do nível do solo (DCS) e na zona de inserção da espiga superior (DCE). Considerando-se estes dois valores, determinou-se a homogeneidade no diâmetro do colmo (HDC), através da expressão $HDC = DCE/DCS$. Posteriormente efetuou-se a contagem de todas as plantas das linhas quatro e cinco das subparcelas, excetuando-se meio metro na extremidade de cada linha. Com base nestes indivíduos, que compuseram a área útil, estimou-se a percentagem de acamamento e quebra de colmos. As plantas foram consideradas acamadas quando o ângulo entre a base do colmo e o nível do solo foi inferior a 45°. Foram considerados quebrados os colmos que apresentavam ruptura significativa no seu tecido de sustentação abaixo do ponto de inserção da espiga superior.

A colheita da área útil foi realizada quando todas as folhas da planta estavam senescidas e a umidade do grão situava-se entre 18 e 22°. Na operação de colheita foram separadas, em embalagens distintas, as espigas coletadas nas plantas tombadas e nas eretas. As espigas foram despalhadas, trilhadas, secas e os grãos pesados separadamente. Com base nos valores obtidos, foram obtidos dois valores para o rendimento de grão em cada tratamento: o

primeiro considerou a produtividade de todas as plantas colhidas na área útil (rendimento total); o segundo considerou apenas a produção das plantas eretas (rendimento hipotético para lavouras com colheita mecanizada, considerando-se que as plantas quebradas não seriam colhidas).

Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância. Os valores referentes a acamamento e quebra de plantas foram transformados previamente a análise, utilizando-se a expressão $(x + 1)^{1/2}$. Os valores de F foram considerados significativos ao nível de significância de 5%. As diferenças entre médias dos híbridos foram confrontadas através do teste de Duncan, ao nível de significância de 5%. Quando o efeito de densidade foi significativo, efetuou-se análise de regressão, testando-se os modelos linear e quadrático e selecionando-se o que apresentou melhor ajuste aos dados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se diferenças significativas entre os híbridos quanto aos parâmetros ligados à arquitetura de planta. Independentemente da densidade de plantas, o híbrido liberado para cultivo na década de 90 DKB 929 externou menor número e comprimento de folha, menor área foliar, menor estatura de planta e maior ponto de inflexão das folhas do que os híbridos cultivados nas décadas de 70 e 80 (Tabela 1).

Tabela 1. Características agronômicas de híbridos de milho liberados comercialmente para cultivo nas décadas de 70 (Ag 12), 80 (Ag 303) e 90 (DKB 929), em quatro populações de planta. Lages, SC, 2000/2001.

Híbrido	Plantas Acamadas (%)					Folhas totais (n°)					Comprimento de folha (cm)				
	25000	50000	75000	100000	Média	25000	50000	75000	100000	Média	25000	50000	75000	100000	Média
Ag 12	0,0	0,0	1,8	4,4	1,2	23,7	23,7	23,7	22,0	23,2 a	85	82	79	77	81 a
Ag 303	1,7	2,3	2,2	2,2	2,1	23,0	22,0	21,7	22,3	22,2 a	89	88	85	83	86 a
DKB 929	0,0	0,0	1,0	0,0	0,2	20,3	20,0	20,0	19,3	18,4 b	80	76	72	67	73 b
Média	0,5	0,8	1,2	1,9	1,1n.s.	22,3	21,8	19,8	21,2	21,3	86 A	83 B	78 C	75 D	80
	Ponto de inflexão da folha (cm)					Área foliar (cm ²)					Estatura de planta (cm)				
	25000	50000	75000	100000	Média	25000	50000	75000	100000	Média	25000	50000	75000	100000	Média
Ag 12	28	28	28	28	28 b	10375	8085	7437	6558	8114 a	302	309	303	295	302 a
Ag 303	28	26	29	28	27 b	10620	9310	7997	6720	8661 a	281	288	297	288	288 b
DKB 929	38	39	42	40	40 a	8641	7826	6633	6167	7316 b	246	248	258	256	252 c
Média	31	32	31	30	31	9879 A	8407 B	7355 C	6482 D	8031	276 B	282 AB	286 A	280 AB	281
	Altura de inserção de espiga (cm)					Altura relativa da espiga ^{1/}					Homogeneidade do diâmetro de colmo ^{2/}				
	25000	50000	75000	100000	Média	25000	50000	75000	100000	Média	25000	50000	75000	100000	Média
Ag 12	157	163	165	161	161 a	0,52	0,53	0,54	0,54	0,53 a	0,66	0,69	0,68	0,71	0,69 b
Ag 303	125	139	147	142	138 b	0,44	0,48	0,49	0,49	0,48 b	0,72	0,73	0,69	0,76	0,72 b
DKB 929	90	95	101	107	98.1	0,37	0,38	0,39	0,41	0,39 c	0,78	0,76	0,78	0,79	0,78 a
Média	123 C	132 B	137 A	137 A	132	0,44	0,46	0,48	0,48	0,47	0,72	0,72	0,72	0,76	0,73

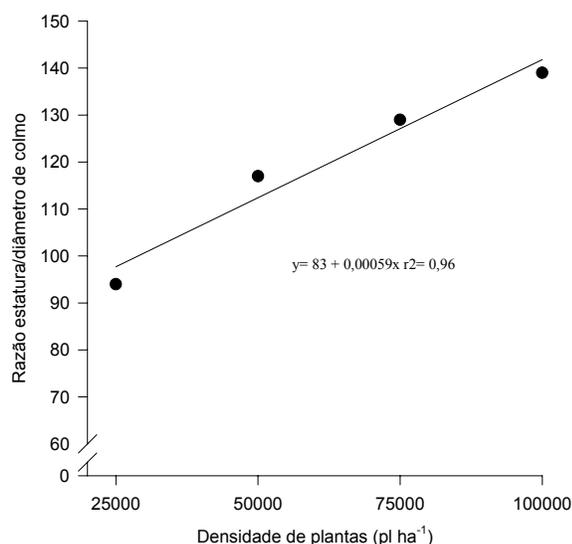
* Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%; n.s. diferenças entre médias não significativas;

^{1/} Altura relativa de espiga= altura de inserção de espiga/estatura de planta;

^{2/} Homogeneidade do diâmetro de colmo= diâmetro de colmo no entre-nó de inserção da espiga/diâmetro de colmo ao nível do solo.

O incremento na densidade de plantas de 25.000 para 100.000 pl ha⁻¹ aumentou linearmente a relação entre estatura de planta e diâmetro de colmo dos híbridos analisados (Figura 1). Para cada 10.000 plantas adicionadas à lavoura, esta relação foi incrementada em 5,9 unidades. Este comportamento confirmou o efeito de estiolamento reportado por BALLARÉ & CASSAL (2000) e por RAJCAN & SWANTON (2001), decorrente das alterações na quantidade e qualidade da radiação incidente verificada em ambientes de alta competição intraespecífica.

Figura 1. Relação entre estatura de planta e diâmetro de colmo ao nível do solo de híbridos de milho liberados comercialmente para cultivo nas décadas de 70 (Ag 12), 80 (Ag 303) e 90 (DKB 929) em função da densidade de plantas. Lages,



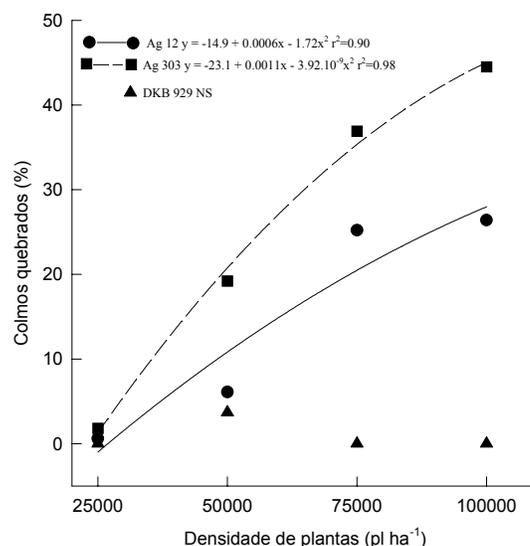
SC, 2000/2001.

A percentagem de plantas acamadas foi inferior a 5% em todas as subparcelas, não sendo afetada significativamente pelos tratamentos avaliados (Tabela 1). O efeito do incremento na população de plantas sobre a quantidade de plantas quebradas variou de acordo com o híbrido (Figura 2). O aumento do número de plantas por hectare estimulou maior quebra de colmos dos híbridos antigos Ag 12 e Ag 303. Por outro lado, o híbrido moderno DKB 929 manteve todas as plantas com colmos eretos até a maturação de colheita, mesmo quando cultivado com 100.000 pl ha⁻¹. Assim, em ambiente com baixa competição intraespecífica (25.000 pl ha⁻¹), não houve diferenças significativas entre genótipos. Já nas populações mais altas, a incidência de plantas quebradas foi significativamente menor no híbrido cultivado na década de 90 do que nos

híbridos cultivados nas décadas de 70 e 80.

Figura 2. Quebra de colmos de híbridos de milho liberados comercialmente para cultivo nas décadas de 70, 80 e 90 em função da densidade de plantas. Lages, SC, 2000/2001.

A relação alométrica entre a altura de inserção da espiga superior no colmo e estatura de planta foi menor no híbrido contemporâneo do que nos híbridos antigos, em todas as densidades de planta (Tabela 1). Por outro lado, a relação entre diâmetro de colmo no entre-nó de inserção



da espiga e diâmetro do colmo no segundo entre-nó acima do nível do solo foi significativamente maior no híbrido moderno do que nos híbridos antigos, independentemente da população de plantas (Tabela 1).

A resposta do rendimento total de grãos dos três híbridos testados foi quadrática (Figura 3). As densidades ótimas para maximizar os rendimentos totais de Ag 12, Ag 28 e DKB 929 foram 71.000, 79.000 e 85.000 pl ha⁻¹, respectivamente. O nível de produtividade total alcançado pelo híbrido mais antigo (Ag 12) e o mais recente (DKB 929) foi semelhante, situando-se em torno de 9.500 kg ha⁻¹ (Figura 3).

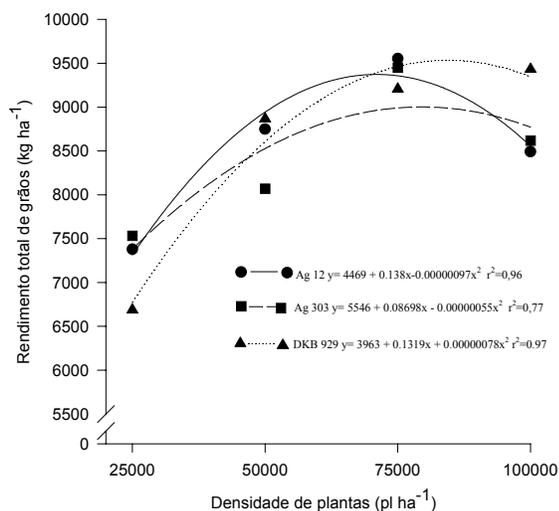


Figura 3. Rendimento total de grãos considerando plantas eretas e quebradas de híbridos de milho liberados comercialmente para cultivo nas décadas de 70, 80 e 90 em função da densidade de plantas. Lages, SC, 2000/2001

Da mesma forma, a diferença entre híbridos quanto ao número de plantas necessário para otimizar o aproveitamento dos recursos ambientais foi de apenas 16,5%. Este resultado é totalmente diferente do obtido quando apenas a produção das plantas que se mantiveram eretas até a colheita foi considerada (Figura 4). Neste caso, quanto maior a densidade de plantas, mais acentuada foi a superioridade produtiva do híbrido DKB 929 sobre os híbridos antigos Ag 12 e Ag 303. Enquanto a densidade ótima do híbrido moderno se manteve em 85.000 pl ha⁻¹, a dos híbridos antigos diminuiu substancialmente em relação aos valores estimados para o rendimento total de grãos. Estes dados reforçam as ponderações feitas por DUVICK & CASSMAN (1999), TOLLENAAR & WU (1999) e por TOLLENAAR & LEE (2002) de que os maiores progressos com o melhoramento de milho foram obtidos através do aumento da tolerância dos híbridos modernos a estresses bióticos e abióticos

e não através do incremento do potencial de rendimento da espécie.

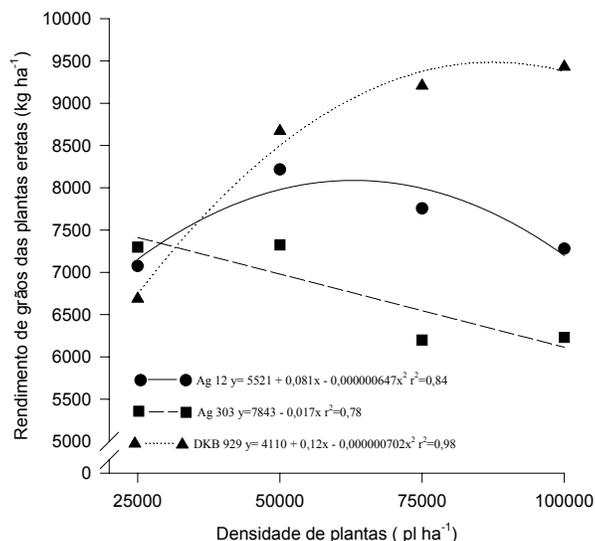


Figura 4. Rendimento de grãos considerando apenas a produção das plantas eretas de híbridos de milho liberados comercialmente para cultivo nas décadas de 70, 80 e 90 em função da densidade de plantas. Lages, SC, 2000/2001.

A arquitetura de planta contrastante entre os híbridos analisados interferiu nos efeitos diferenciados do incremento na densidade de plantas sobre a percentagem de colmos quebrados. A menor altura relativa de espiga do híbrido moderno (Tabela 1) foi benéfica para a manutenção das plantas eretas até a colheita (Figura 2). Quanto maior a relação entre altura de inserção de espiga e estatura de planta, mais deslocado está o centro de gravidade de planta, o que favorece a quebra de colmos. Este fato é particularmente relevante para espécies como o milho, que aloca cerca de 50% da fitomassa total nos grãos ao final do seu ciclo (SANGOI et al., 2002c). Assim, a menor distância entre o ponto de inserção da espiga e o solo do DKB 929 contribuiu para o melhor equilíbrio da planta, minimizando a quebra de colmos, principalmente nas densidades mais altas, nas quais o diâmetro desta estrutura é menor.

O diâmetro de colmo do milho reduz-se da base para o ápice (RITCHIE & HANWAY, 1993). A maior relação alométrica entre os diâmetros do colmo na zona de inserção da espiga e próximo do nível do solo do DKB 929

indicam que houve maior homogeneidade na espessura dos entre-nós nos terços inferior e médio das plantas do híbrido moderno, o que também pode ter propiciado melhor condição de sustentabilidade às plantas, em relação aos híbridos antigos.

As características foliares dos genótipos testados possivelmente interagiram com as variações na densidade de plantas, modificando quantitativa e qualitativamente a radiação incidente no interior da comunidade. Tais alterações também devem ter contribuído para as diferenças observadas na percentagem de plantas quebradas. O menor número de folhas e a presença de folhas mais curtas e eretas do híbrido contemporâneo (Tabela 1) provavelmente reduziram a absorção seletiva de radiação na faixa do vermelho pelos estratos superiores do dossel, diminuindo a relação vermelho extremo/vermelho e, conseqüentemente, o estiolamento. Diferenças entre híbridos de milho na interceptação e atenuação da radiação solar incidente foram reportadas por MADDONI & OTEGUI (1996). O ideotipo compacto de planta do híbrido moderno também pode ter minimizado o sombreamento intraespecífico em estandes adensados, aumentando a eficiência de interceptação da radiação solar por todos os estratos da comunidade. Com isto, incrementa-se a capacidade fotossintética da planta e a disponibilidade de fotoassimilados para formação de compostos estruturais que minimizem a fragilidade do colmo ao final do enchimento de grãos.

CONCLUSÃO

1. O híbrido DKB 929 apresentou menor percentagem de plantas quebradas na colheita do que os híbridos antigos Ag 12 e Ag 303 quando cultivado em ambientes de alta competição intraespecífica.
2. A menor altura relativa de espiga e a maior homogeneidade no diâmetro de colmo contribuíram para prevenir a quebra de colmos do híbrido DKB 929 antes da maturação de colheita.
3. A resistência do colmo a quebra antes da colheita é fundamental para que o potencial produtivo de híbridos de milho possa ser devidamente explorado através do aumento na densidade de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.L., SANGOI, L., ENDER, M. Incremento na densidade de plantas: uma alternativa para aumentar o rendimento de grãos de milho em regiões de curta estação estival de crescimento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 23-29, 2000.
- ARGENTA, G., SILVA, P.R.F., SANGOI, L. Arranjo de plantas em milho: análise do estado da arte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 1075-1084, 2001.
- BALLARÉ, C.L., CASAL, J.J. Light signals perceived by crop and weed plants. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 67, n.1, p. 149-160, 2000.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO-RS/SC. **Recomendações de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Passo Fundo: SBCS-Núcleo Regional Sul, 1995, 146p.
- DUVICK, D.N., CASSMAN, K.G. Post-green revolution trends in yield potential of temperate maize in the North-Central United States. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1622-1630, 1999.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 412 p.
- HONDROYIANNI, E., PAPAKOSTA, D.K., GAGIANAS, A. A., TSATSARELIS, K.A. Corn stalk traits related to lodging resistance in two soils of differing salinity. **Maydica**, Bergamo, v. 45, p. 125-133, 2000.
- MADDONNI, G.A., OTEGUI, M.E. Leaf area, light interception, and crop development in maize. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 48, p. 81-87, 1996.
- RAJCAN, I., SWANTON, C.J. Understanding maize-weed competition: resource competition, light quality and the whole plant. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.71, n. 1, p. 139-150, 2001.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J. How a corn plant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 26p. (Special Report, 48).
- SANGOI, L. Understanding plant density effects on maize growth and development: an important issue to maximize grain yield. **Ciência Rural**, v. 31, n.1, p. 159-168, 2001.
- SANGOI, L., ENDER, M., GUIDOLIN, A.F., BOGO, A.; KOTHE, D. M. Evolução da tolerância a doenças de híbridos de milho de diferentes épocas em três populações

de planta **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 17-21, 2000.

SANGOI, L., ALMEIDA, M. L., SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G. Bases morfo-fisiológicas para a maior tolerância dos híbridos modernos de milho a altas densidades de plantas. **Bragantia**, 2002b, prelo.

SANGOI, L., GRACIETTI, M.A., RAMPAZZO, C., BIANCHET, P. Response of Brazilian maize hybrids from different eras to changes in plant density. **Field Crops Research**, Amsterdam, prelo, 2002c

SANGOI, L.; LECH, V. A.; RAMPAZZO, C.; GRACIETTI, L. C. Acúmulo de matéria seca em híbridos de milho sob diferentes relações entre fonte e dreno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 259-267, 2002a.

STEWART, D.W., DWYER, L.M. Mathematical characterization of leaf shape and area of maize hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 422-427, 1997.

SLAFFER, G.A.; OTEGUI, M. Is there a niche for physiology in future genetic improvement of maize yields? In: SLAFFER, G.A.; OTEGUI (Ed.). **Physiological bases for maize improvement**. New York: Haworth Press, 2000. cap.1, p.1-14.

TOLLENAAR, M. Is low plant density a stress in maize? **Maydica**, Bergamo, v.37, p. 305-311, 1992.

TOLLENAAR, M., LEE, E. Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 75, p. 161-169. 2002.

TOLLENAAR, M., MCCULLOUGH, D.E., DWYER, L.M. Physiological basis of the genetic improvement of corn. In: SLAFFER, G.A. **Genetic improvement of field crops**. New York: Marcel Dekker, 1994. Cap.4, p.183-236.

TOLLENAAR, M., WU, J. Yield improvement in temperate maize is attributable to greater stress tolerance. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1597-1604, 1999.

WESTGATE, M.E., FORCELLA, F., REICOSKY, D.D., SOMSEN, J. Rapid canopy closure for maize production in the northern US corn belt: Radiation-use efficiency and grain yield. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.49, n.2, p. 249-258, 1997.

SOBRESSEMEADURA DO CORNICHÃO (*Lotus corniculatus* L.) cv. SÃO GABRIEL EM PASTAGEM NATURAL – DIFERIMENTO E ADUBAÇÃO

SOD-SEEDING OF BIRDSFOOT TREFOIL (*Lotus corniculatus* L.) cv. SÃO GABRIEL ON NATURAL PASTURE – DEFERMENT AND FERTILIZATION

Nelson Eduardo Prestes¹; Aino Victor Ávila Jacques²

RESUMO

Foi conduzido na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul-RS, um experimento de sobressemeadura de cornichão cv. São Gabriel sobre pastagem natural. Foram avaliados 3 tratamentos de diferimento da pastagem (14, 28 e 56 dias) e 2 de adubação de final de verão (sem e com adubação) – 120 kg/ha de K₂O e 105 kg/ha de P₂O₅. O rendimento de MS foi avaliado através de cortes a 8,0 cm de altura. O delineamento usado foi parcelas subdivididas em blocos casualizados com 4 repetições, com os diferimentos nas parcelas principais e adubação nas subparcelas. Os diferimentos de 28 e 56 dias apresentaram rendimento de MS superior ao de 14 dias, na 1ª avaliação de outono. Esta superioridade dos maiores diferimentos ocorreu também na avaliação de 25/11/94, quando o diferimento de 28 dias foi superior aos demais, e o de 56 dias ficando em posição intermediária. Com o aumento do período de descanso da pastagem, durante o verão, aumentou a população de plantas. A adubação de final de verão favoreceu o rendimento de MS de forragem total, como também a persistência do cornichão.

PALAVRAS-CHAVE: cornichão, diferimento, adubação, persistência, pastagem natural.

SUMMARY

At UFRGS's Experimental Station in Eldorado do Sul – RS, an experiment of sod-seeding birdsfoot trefoil cv. São Gabriel in natural pasture was carried out. Were studied three deferment periods (14, 28 and 56 days) and two late summer fertilizations (with and without fertilization) – 120 kg/ha of K₂O and 105 kg/ha of P₂O₅. The DM yield was evaluated with cuttings at 8,0 cm – stubble height. A split-plot experimental design with 4 replications was used: deferment in the main plots and fertilization in the sub-plots. The deferment treatments of 28 and 56 days resulted in higher DM yields than the 14

days treatment, during the fall evaluation. The advantage of the greatest deferment periods also occurred during the spring evaluation, when the 28 days treatment produced the best result whereas the 56 days had an intermediate yield. Higher pasture resting periods, during the summer, resulted in maximum plant population. The late summer topdressing favored the total forage DM yield as well as the birdsfoot trefoil persistence.

KEY WORDS: birdsfoot trefoil, deferment, topdressing, persistence, natural pasture.

INTRODUÇÃO

As pastagens naturais são a base da exploração pecuária no Rio Grande do Sul, representando atualmente cerca de 37% da área total do Estado, ou seja, 10,5 milhões de hectares (IBGE, 1995), contribuindo com cerca de 90% da alimentação dos rebanhos bovino e ovino (MOHRDIECK, 1980). Estas pastagens apresentam três épocas de produção: alta, de janeiro a abril; baixa, de maio a setembro e intermediária, de outubro a dezembro. Apresentam uma produção média anual de 5.765 kg/ha de matéria seca (MS) (FREITAS et al., 1976). Em função das condições climáticas, tem-se um período bastante crítico na disponibilidade de forragem durante os meses de outono - inverno.

O melhoramento da pastagem natural, como alternativa para aumentar o rendimento das pastagens, reveste-se de importância, principalmente por envolver baixos custos, manter a estrutura física do solo e não eliminar as espécies nativas que em determinadas condições

¹ Eng. Agrº M.Sc., Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (EPAGRI), EELages, Caixa Postal 181, Lages, SC, CEP 88.502-970 – E. mail prestes@epagri.rct-sc.br

² Eng. Agrº Ph.D, Professor Titular da Faculdade de Agronomia da UFRGS – Pesquisador do CNPq. Caixa Postal 776, Porto Alegre, RS, CEP 90.001-970 - E.mail aino@vortex.ufrg.br

podem contribuir para melhorar a composição da forragem (BARRETO et al., 1978). A sobressemeadura de espécies de inverno, tanto gramíneas como leguminosas, roçadas, adequação da lotação e diferimento são algumas das práticas utilizadas em um melhoramento de campo natural (NABINGER, 1980).

Pelas dificuldades impostas pelos métodos convencionais de implantação de pastagens, surge a necessidade de buscar outros de menor custo para o melhoramento do campo natural (MAS, 1992). BRASIL et al. (1987), em Bagé - RS, comparando sistemas de implantação de espécies de estação fria sobre pastagem natural, puderam concluir que as pastagens implantadas pelo método convencional foram as mais produtivas apenas no 1º ano, sendo que nos anos seguintes a produção de MS foi maior nos sistemas de sobressemeadura. Assim, a partir do 2º ano é possível obter resultados semelhantes ao obtido com o preparo convencional (JACQUES, 1993). Utilizando espécie leguminosa, como fonte de nitrogênio, associada à gramínea em campo natural, SCHOLL et al. (1976) concluíram que o trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum* Savi), em densidade de plantio de 6,0 kg/ha equívale a 90,0 kg/ha de nitrogênio. Porém, no uso de pastagens naturais tem que haver a conciliação entre produção animal e aspectos ecológicos, visando assim a preservação e desenvolvimento de todo o ecossistema (PAIM & BOLDRINI, 1993).

O cornichão (*L. corniculatus*) é uma espécie recomendada pela sua capacidade em manter-se em solos relativamente ácidos, pouco férteis, onde normalmente outras leguminosas não se estabelecem ou tem pouca persistência. Apesar desta tolerância, responde bem à calagem e, para se ter produções adequadas, a fertilidade deve ser melhorada, principalmente com aplicações de fósforo e potássio (HUGHES, 1973). Além da fertilização fosfatada, o cornichão cv. São Gabriel apresenta melhor desenvolvimento com pH do solo entre 6,0 e 7,0. Porém, tolera valores próximos de 4,5 e acima de 7,0 (SALERNO & TCACENCO, 1986). POLI & CARMONA (1966) obtiveram incrementos de 9,7; 15,5 e 18,9% na produção de cornichão, quando usaram doses de 100, 200 e 300 kg/ha de P₂O₅, respectivamente.

Tendo em vista a necessidade de se obter informações mais detalhadas a respeito do comportamento do cornichão cv. São Gabriel, implantado sobre pastagem

natural, este estudo teve por objetivos: determinar a curva de crescimento da pastagem, em função do diferimento e adubação; identificar o melhor período de diferimento, para proporcionar uma melhor persistência da espécie introduzida e posterior utilização da pastagem nos meses de outono.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido sobre uma pastagem natural, na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), no município de Eldorado do Sul, RS. Localizada na região fisiográfica denominada Depressão Central, a 30°05'52" de latitude Sul e 51°39'08" de longitude Oeste, com altitude média de 46 metros, no período de julho de 1993 a novembro de 1994.

O solo da área experimental é classificado como Plintossolo, e pertence à unidade de mapeamento Arroio dos Ratos, com relevo suavemente ondulado. São solos ácidos, com baixos teores de fósforo e matéria orgânica, não apresentando problemas quanto à toxidez de alumínio (MELLO et al., 1966; CAMARGO et al., 1987; EMBRAPA, 1999).

Inicialmente a área foi roçada e submetida a uma gradagem leve. Após realizou-se a calagem com uma quantidade equivalente de 3,0 toneladas/ha de calcário dolomítico com PRNT 60%.

As sementes de cornichão cv. São Gabriel, com 83% de germinação, previamente inoculadas e peletizadas, foram sobressemeadas em 01/07/93 com uma densidade de 20 kg/ha. A adubação, feita logo após a sementeira, nas quantidades de 120 kg/ha de K₂O e 105 kg de P₂O₅. Após, utilizou-se rolo compactador tipo "Brillion" para promover um melhor contato da semente com o solo.

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas em blocos casualizados com 4 repetições. Foram avaliados dois tratamentos; diferimento em três níveis: 14 (sem diferimento: SD), 28 (D-28) e 56 (D-56) dias; e adubação de final de verão em dois níveis: com (A1) em sem (A0), nas mesmas quantidades usadas no estabelecimento. Na parcela principal aplicou-se o tratamento de diferimento e na subparcela o de adubação.

A leitura do estande inicial foi feita 65 dias após o plantio, utilizando quadrados de ferro de 20,0 cm de lado, sendo verificado, em média, a existência de 780 plantas de cornichão/m². O estande final foi determinado em 24/08/94. Nesta ocasião utilizaram-se quadrados maiores, com 50,0 cm de lado.

Para determinação de MS da forragem foram feitos cortes com uso de segadeira tipo "Jari" com faixa de corte de 1,0 m de largura e a 8,0 cm de altura (área útil de 7,65 m²). Em 23/12/93, com o surgimento dos primeiros legumes do cornichão, efetuou-se um corte em toda a área experimental, e a partir de então foram estabelecidos os três tratamentos de descanso da pastagem: SD, com cortes a

cada duas semanas; D-28, com cortes a cada quatro semanas; e D-56 com apenas um corte em 21/02/94. Com o término do maior período de descanso foi realizada a adubação de final de verão. A partir de então, os cortes foram a intervalos fixos de 42 dias, nas datas de 05/04; 17/05 e 28/06/94. O corte de avaliação final foi realizado em 25/11/94, com altura de corte de 6,0 cm.

A forragem colhida, em cada data de corte, foi pesada e submetida à separação botânica com a determinação dos seguintes componentes: cornichão, gramíneas, outras leguminosas, plantas indesejáveis e material morto. Cada componente, devidamente embalado, foi mantido em estufa de ar forçado à temperatura constante de 60 °C por aproximadamente 72 horas.

Os efeitos dos tratamentos de diferimento e adubação foram analisados conforme modelo proposto para delineamento de parcelas subdivididas em blocos casualizados em arranjo fatorial. Para análise estatística da informação coletada, foi utilizado o programa computacional SAS. Para a comparação entre médias foi usado o teste de Duncan.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Período de janeiro a fevereiro de 1994

Neste período foram aplicados apenas os tratamentos de diferimento, sendo que a análise de variância evidenciou significância estatística ($P < 0,05$) para seus respectivos efeitos sobre o rendimento MS de todos os componentes da pastagem, com exceção para o componente outras leguminosas.

Tanto o componente cornichão como as espécies gramíneas nativas tiveram menor contribuição devido à realização de cortes mais frequentes, principalmente no tratamento SD. Apesar do componente cornichão não ter apresentado diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos de D-28 e SD, a tendência em favor do período de maior descanso foi bastante acentuada. Esta similaridade provavelmente tenha ocorrido em virtude da implantação em sobressemeadura do cornichão, método que dificilmente proporciona um estabelecimento uniforme,

fazendo com que existam variações quanto à sua participação na pastagem (Tabela 1). O componente outras leguminosas, constituído basicamente por *Desmodium incanum* DC., originalmente de reduzida contribuição, mostrou-se indiferente para os regimes de cortes aplicados. No entanto, também, apresentou tendência para maior acúmulo de MS com o aumento do intervalo entre cortes (Tabela 1). Com a totalização da produção de MS dos componentes cornichão, gramíneas e outras leguminosas formou-se o componente forragem total, o qual apresentou acúmulo de MS superior ($P \leq 0,05$) nos tratamentos D-28 e D-56, em relação ao SD (Tabela 1). O componente plantas indesejáveis, constituído basicamente por *Eryngium sp.* e *Vernonia nudiflora* Less, também reduziu sua participação de maneira significativa ($P \leq 0,05$) à medida que os cortes foram mais frequentes. O que fez com que a competição entre este componente e a forragem total fosse mais acentuada nos maiores diferimentos (Tabela 1). Comportamento inverso foi apresentado pelo componente material morto, apresentando maior acúmulo de MS quando aplicou-se o tratamento SD, em parte devido à dificuldade de coletar-se toda a matéria verde cortada (Tabela 1). A produção total de MS apresentou a mesma tendência da forragem total, obtendo-se produções superiores ($P \leq 0,05$) para os tratamentos D-56 e D-28 (Tabela 1).

Os resultados obtidos neste período assemelham-se com aos de outros autores, no que diz respeito ao maior acúmulo de MS de cornichão, tanto em cultivo estreme como em misturas, quando permite-se que esta espécie recomponha suas reservas através de um maior intervalo entre cortes (PIERRE & JACKOBS, 1953; LANGILLE et al., 1968; ARAUJO & JACQUES, 1974; MOOJEN & SAIBRO, 1981; ALISON & HOVELAND, 1989; FLARESSO & SAIBRO, 1992).

Período de abril a novembro de 1994

As análises de variância evidenciaram significância estatística para os efeitos dos

Tabela 1. Rendimento de MS dos componentes de uma pastagem natural com introdução de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel, em função dos tratamentos de diferimento (SD: sem diferimento; D-28: diferimento de 28 dias; D-56: diferimento de 56 dias) aplicados durante o verão. Média de 4 repetições, em kg/ha. Período de janeiro a fevereiro de 1994. EEA-UFRGS.

COMPONENTES	DIFERIMENTOS		
	SD	D-28	D-56
Cornichão	16,0 b	125,0 ab	194,0 a
Gramíneas	26,0 b	74,0 a	58,0 ab
Outras Leguminosas	7,0 a	7,0 a	12,0 a

Forragem Total	49,0 b	206,0 a	264,0 a
Plantas Indesejáveis	54,0 c	155,0 a	234,0 a
Material Morto	208,0 a	122,0 b	53,0 c
Total	311,0 b	483,0 a	551,0 a

Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$). tratamentos de diferimento, sobre o rendimento MS dos componentes da pastagem da seguinte forma: em 05/04/94, para gramíneas ($P=0,062$), forragem total ($P<0,05$), material morto ($P=0,063$) e total de MS ($P<0,05$); em 17/05/94, somente para plantas indesejáveis ($P<0,05$); e em 25/11/94, para o cornichão ($P=0,068$), forragem total ($P=0,061$) e total de MS ($P<0,05$). Os tratamentos de adubação de final de verão tiveram efeito ($P<0,05$) sobre os componentes: cornichão, forragem total e total de MS, em todas as avaliações deste período; gramíneas, única exceção para a avaliação de 25/11/94; outras leguminosas e plantas indesejáveis, em 05/04/94; e material morto, na avaliação de 17/05/94.

No período outono - inverno (Tabela 2), observa-se que para a espécie introduzida, cornichão cv. São Gabriel, não houve diferença para qualquer tratamento, até 28/06, apesar de notada tendência em favor dos maiores diferimentos. Entretanto, no corte de primavera (25/11), o rendimento de cornichão foi maior no diferimento de 56 dias. Porém, para o componente gramíneas houve diferença ($P\leq 0,05$) somente na primeira avaliação de outono (05/04) em favor do tratamento D-28, ficando o diferimento de 56 dias em uma posição intermediária (Tabela 2). O componente outras leguminosas novamente mostrou-se indiferente aos tratamentos de diferimento, durante todo o período (Tabela 2).

O componente forragem total, em 05/04, foi favorecido ($P\leq 0,05$) pelos maiores períodos de descanso da pastagem. A partir desta avaliação, com o avanço da estação fria, houve redução generalizada no rendimento de forragem total, sendo o cornichão responsável pela maior contribuição de MS, demonstrando dessa forma sua maior tolerância às condições climáticas ocorrentes. Na avaliação de primavera (25/11), as diferenças entre os tratamentos de diferimento foram evidentes, ficando o tratamento D-28 com o maior rendimento (Tabela 2).

O incremento no rendimento de MS no corte de primavera deve-se ao fato do maior intervalo entre cortes que foi proporcionado, de 150 dias e não mais 42, como também das condições climáticas serem mais favoráveis

Tabela 2.

Rendimento de MS dos componentes de uma pastagem natural, com introdução de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel, em função dos tratamentos de diferimento (SD: sem diferimento; D-28: diferimento de 28 dias; D-56: diferimento de 56 dias). Período de 05/04 a 25/11/94. Média de 4 repetições, em kg/ha. EEA-UFRGS.

Componentes	05/04/94			17/05/94			28/06/94			25/11/94		
	SD	D-28	D-56	SD	D-28	D-56	SD	D-28	D-56	SD	D-28	D-56
Cornichão	40,0a	92,0a	97,0a	29,0a	68,0a	59,0a	16,0a	33,0a	30,0a	626,0b	1.018,0ab	1.057,0a
Gramíneas	131,0b	178,0a	137,0ab	28,0a	36,0a	29,0a	18,0a	28,0a	22,0a	521,0a	513,0a	449,0a
Outras												

para o crescimento das espécies presentes. No caso do cornichão cv. São Gabriel, esse comportamento está de acordo com a curva de crescimento estabelecida por POLI & CARMONA (1966), na qual o maior crescimento desta espécie ocorreu no período de setembro a novembro.

A adubação de final de verão proporcionou aumento expressivo ($P\leq 0,05$) na disponibilidade de MS do componente cornichão em todas as avaliações. Porém, para o componente gramíneas esta resposta somente não aconteceu no corte final, de 25/11/94 (Tabela 3), o que pode ser explicado pelo fato das espécies de estação fria já estarem com seu ciclo concluído e as de estação quente, iniciando seu novo crescimento. O componente outras leguminosas, formado basicamente por espécies de estação quente, somente apresentou resposta ($P\leq 0,05$) na avaliação de 05/04, sendo sua participação ainda mais reduzida pelo avanço da estação fria (Tabela 3). A forragem total também foi beneficiada ($P\leq 0,05$) pelo efeito do tratamento de adubação, sendo o cornichão o componente que melhor resposta apresentou a este tratamento. Na média dos tratamentos de diferimento adubados, o cornichão apresentou rendimento equivalente e até mesmo superior ao da forragem total, na média dos tratamentos de diferimento não adubados (Tabela 3). Confirma-se assim a resposta que esta espécie apresenta em relação à adubação (POLI & CARMONA, 1966; WEDIN et al., 1967).

Persistência

A análise de variância evidenciou significância estatística para os efeitos dos tratamentos de diferimento ($P=0,093$) e adubação de final de verão ($P\leq 0,05$) sobre a condição do estande final do componente cornichão. Optou-se por aceitar nível mais elevado de significância devido às particularidades que envolvem a introdução por meio de sobresemeadura, em uma comunidade vegetal tão heterogênea e

Leguminosas	7,0a	11,0a	10,0a	2,0a	2,0a	1,0a	5,0a	2,0a	1,0a	140,0a	149,0a	105,0a
FORAGEM Total	178,0b	281,0a	244,0a	59,0a	160,0a	89,0a	39,0a	63,0a	53,0a	1.287,0b	1.680,0a	1.611,0ab
Plantas												
Indesejáveis	176,0a	173,0a	184,0a	25,0b	33,0ab	44,0a	22,0a	27,0a	30,0a	390,0a	377,0a	333,0a
MATERIAL MORTO	9,0b	22,0a	20,0ab	12,0a	14,0a	14,0a	25,0a	31,0a	28,0a	175,0a	149,0a	210,0a
Total	363,0b	476,0a	448,0a	96,0a	153,0a	147,0a	86,0a	121,0a	111,0a	1.852,0b	2.206,0a	2.154,0a

Médias, nas linhas, seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$).

Tabela 3. Rendimento de MS dos componentes de uma pastagem natural, com introdução de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel, em função dos tratamentos de adubação (A0: sem adubação; A1: com adubação) de final de verão. Período de 05/04 a 25/11/94. Média de 4 repetições, em kg/ha. EEA-UFRGS.

Componentes	05/04/94		17/05/94		28/06/94		25/11/94	
	A0	A1	A0	A1	A0	A1	A0	A1
Cornichão	41,0 b	112,0 a	21,0 b	83,0 a	9,0 b	44,0 a	605,0 b	1.197,0 a
Gramíneas	118,0 b	180,0 a	20,0 b	42,0 a	15,0 b	30,0 a	497,0 a	492,0 a
Outras								
Leguminosas	5,0 b	13,0 a	1,0 a	3,0 a	1,0 a	4,0 a	89,0 a	171,0 a
FORAGEM Total	164,0 b	305,0 a	42,0 b	128,0 a	25,0 b	78,0 a	1.191,0 b	1.860,0 a
Plantas								
Indesejáveis	152,0 b	203,0 a	30,0 a	39,0 a	24,0 a	29,0 a	409,0 a	324,0 a
MATERIAL MORTO	16,0 a	19,0 a	10,0 b	17,0 a	25,0 a	31,0 a	157,0 a	199,0 a
Total	332,0 b	527,0 a	82,0 b	184,0 a	74,0 b	138,0 a	1.757,0 b	2.383,0 a

Médias, nas linhas, seguidas pela mesma não diferem significativamente

competitiva como a pastagem natural. Além do que, trata-se de resultados de primeiro ano.

Após 11 meses da avaliação do estande inicial, houve generalizada e acentuada redução na população de plantas. Apesar do longo período, os efeitos diferenciais dos tratamentos de descanso da pastagem e adubação, aplicados durante o verão, ainda foram observados. Os maiores períodos de descanso permitiram a persistência dos melhores estandes de cornichão, com 50,0 e 51,0 plantas/m², respectivamente, os quais foram superiores ($P \leq 0,05$) ao apresentado pela pastagem não diferida, com 26,0 plantas/m². A adubação final de verão também teve efeito ($P \leq 0,05$) sobre a persistência do cornichão, independente dos diferimentos aplicados (Tabela 4).

McGRAW et al. (1986) verificaram que populações de cornichão inferiores a 30,0 plantas/m², em cultivo estreme, são insuficientes para apresentarem um aceitável rendimento de MS por unidade de área. Portanto, o manejo do cornichão deve ser direcionado para possibilitar a ressemeadura natural e assim persistir ao longo dos anos (ARAUJO & JACQUES, 1974; BEUSELINCK & McGRAW, 1989).

Tabela 4. Estande do componente cornichão (*Lotus*

corniculatus L.) cv. São Gabriel, em 24/08/94, sobressemeado em uma pastagem natural, em função dos tratamentos de diferimento (SD: sem diferimento; D-28: diferimento de 28 dias e D-56: diferimento de 56 dias) e de adubação (A0: sem; A1: com) de final de verão. Média de 4 repetições, em n° de plantas/ m². EEA-UFRGS.

Diferimentos	N° de plantas / m ²
SD	26,0 b
D-28	50,0 a
D-56	51,0 a
Adubação	N° de plantas / m ²
A0	34,0 b
A1	51,0 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$).

CONCLUSÃO

A introdução do cornichão cv. São Gabriel aumenta o rendimento de MS da pastagem natural e permite uma melhor distribuição da forragem disponível ao longo do tempo.

Os maiores períodos de descanso da pastagem favorecem o rendimento de MS de forragem, enquanto que os cortes mais frequentes prejudicam, principalmente no caso do cornichão.

Os diferimentos mais longos resultam nos melhores estandes e em maior persistência do cornichão, quando existe maior benefício da ressemeadura natural.

A adubação de final de verão proporciona aumentos expressivos no rendimento de MS da forragem, assim como na persistência da espécie introduzida, independentemente do diferimento aplicado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALISON Jr., M. W.; HOVELAND, C. S. Birdsfoot trefoil management. II. Yield, quality and stand evaluation. **Agron. J.**, Madison, v. 81, p. 745-749, 1989.
- ARAUJO, J. C.; JACQUES, A. V. A. Características morfológicas e produção de matéria seca de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) colhido em diferentes estádios de crescimento e a duas alturas de corte. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, Viçosa, v.3, p. 139-147, 1974.
- BARRETO, I. L.; VINCENZI, M. L.; NABINGER, C. Melhoramento e renovação de pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 5, 1978, Piracicaba. **Anais ... Piracicaba, SP**, 1978. p. 28-63.
- BEUSELINCK, P. R.; MCGRAW, R. L. Environmental considerations for Lotus production: seed versus herbage. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 16, 1989. **Proceedings ... Nice, France**, 1989. p. 649-650.
- BRASIL, N. E. T.; GONÇALVES, J. O. N.; MACEDO, dos S. L. de. Sistemas de implantação com forrageiras de inverno. In: EMBRAPA/CNPO. **Forrageiras: coletânea das pesquisas**, Bagé, RS, v.1, p. 405-409, 1987.
- CAMARGO, M. N.; KLAMT, E.; KAUFFMAN, J. H. 1987. Classificação de solos usada em levantamentos pedológicos no Brasil. **Bol. Inf. Soc. Bras. Ci. Solo**, Campinas, v. 41, n. 6, p. 497-501.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. – Brasília: Embrapa Solos, 1999. xxvi, 412 p.
- FLARESSO, J. A.; SAIBRO, J. C. de. Influência de regimes de corte e adubação no rendimento de matéria seca, reservas de glicídios não estruturais e ressemeadura natural de *Lotus corniculatus* L. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 181-188, 1992.
- FREITAS, E. A. G.; LÓPEZ, J.; PRATES, E. R. Produtividade de matéria seca, proteína digestível e nutrientes digestíveis totais em pastagem nativa do Rio Grande do Sul. **Anu. Tec. do IPZFO**, Porto Alegre. V.3, p. 454-515, 1976.
- HUGHES, H. D. Cuernecillo. In: HUGHES, H. D.; HEATH, M. E.; METCALFE, D. S., (Eds.) **Forrages**. México, Continental. Cap. 18, p. 215-232, 1973.
- IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro. v. 52, p. 507, 1995.
- JACQUES, A. V. A. Melhoramento de pastagens naturais: Introdução de espécies de estação fria. In: **Campo Nativo: Melhoramento e Manejo**. Esteio, RS, FEDERACITE IV, 1993. p. 24-31,
- LANGILLE, J. E.; Mac LEOD, L. B.; WARREN, F. S. Influence of harvesting management on yield, carbohydrate reserves, etiolated regrowth, and potassium uptake of birdsfoot trefoil. **Can. J. Plant. Sci.**, Ottawa. V. 48, p. 575-580, 1968.
- MAS, C. Mejoramientos extensivos: Antecedentes. In: **Mejoramientos Extensivos en la Región Este**. Resultados Experimentales. Treinta y Tres, INIA, Estacion Experimental del Este. Uruguay. p. 01-11, 1992.
- MCGRAW, R. L.; BEUSELINCK, P. R.; INGRAM, K. T. Plant population density effects on seed yield of birdsfoot trefoil. **Agron. J.**, Madison, v. 78, p. 201-205, 1986.
- MELLO de O.; LEMOS de, R. C.; ABRÃO, P. V. R.; AZOLIN, M. A. D.; SANTOS dos, M. da C. L.; CARVALHO de, A. P. 1966. Levantamento em série dos solos do Centro Agrônomo. **Rev. Fac. Agron. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 8, p. 7-155.
- MOHRDIECK, K. H. Formações Campestres do Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO SOBRE PASTAGENS “DE QUE PASTAGENS NECESSITAMOS”, 1980, Porto Alegre, **Anais ... Porto Alegre**, 1980. FARSUL. p. 18-27.
- MOOJEN, E. L.; SAIBRO, J. C. de. Efeito de regimes de corte sobre o rendimento e qualidade de misturas forrageiras de estação fria. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 16, p. 101-109, 1981.

NABINGER, C. Técnicas de Melhoramento de Pastagens Naturais no Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO SOBRE PASTAGENS “DE QUE PASTAGENS NECESSITAMOS”, 1980, Porto Alegre, **Anais ...** Porto Alegre, 1980. FARSUL. p. 28-58.

PAIM, N. R.; BOLDRINI, I. I. Ressemeadura natural em pastagens. In: **Campo Nativo: Melhoramento e Manejo**. Esteio, RS, FEDERACITE IV, 1993. p. 47-53.

PIERRE, J. J.; JACKOBS, J. A. The effect of cutting treatments on birdsfoot trefoil. **Agron. J.**, Madison, v. 45, p. 463- 468, 1953.

POLI, J. L. E. H.; CARMONA, P. S. **Sinopse dos ensaios da Estação Experimental de Forrageiras de São Gabriel de 1941-1965**. Porto Alegre, Secretaria da Agricultura, Estado do Rio Grande do Sul, 1966. 212 p. Boletim Técnico, 5.

SALERNO, A. R.; TCACENCO, F.A. **Características e técnicas de cultivo de forrageiras de estação fria no Vale do Itajaí e Litoral de Santa Catarina**. Florianópolis. EMPASC, 1986. 56p. Boletim Técnico, 38.

SCHOLL, J. M.; LOBATO, J. F. P.; BARRETO, I. L. Improvement of pastures by direct seeding into native grass in Southern Brazil with oats, and with nitrogen supplied by fertilizer or arrowleaf clover. **Turrialba**. San José. v. 26, n. 2, p. 144-149, 1976.

WEDIN, W. F.; VETTER, R.L.; SCHOLL, J. M.; WOODS, W. R. An evaluation of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) in pasture improvement. **Agron. J.**, Madison, v. 59, p. 525-528, 1967.

DESEMPENHO DE DOIS TIPOS DE CORTADORAS-ARRANCADORAS DE FEIJÃO

PERFORMANCE EVALUATION OF TWO BEAN HARVESTERS

Alberto Kazushi Nagaoka¹; Peter John Martyn²; Haroldo Carlos Fernandes³;
Roberto Kazuhiko Zito⁴; Paulo Roberto Cecon⁵

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de duas cortadoras-arrancadoras de feijão, sendo a primeira com discos recortados e a segunda com lâminas de corte. Os ensaios foram realizados na Fazenda São João, no município de Coimbra, MG. Avaliou-se as plantas não arrancadas, as perdas por danos, o consumo de combustível e a capacidade de campo teórica durante a colheita em lavoura de feijão do cultivar Ouro Negro, tipo III. O trator utilizado para tração da arrancadora foi o VALMET 68 Cafeeiro, com 43 kW de potência no motor, bitola de 1.120 mm e velocidades de 0,78 m.s⁻¹ e 1,25 m.s⁻¹. Os dados obtidos foram analisados, considerando-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, no esquema de parcelas subdivididas, tendo na parcela os equipamentos e na subparcela as velocidades do trator, com seis repetições. Os resultados mostraram que o número de plantas não arrancadas foi maior (P<0,05) para a cortadora-arrancadora de feijão com discos recortados, com velocidade de 0,78 m.s⁻¹. As perdas por danos foram maiores (P<0,05) quando utilizou-se a cortadora-arrancadora de feijão com lâminas de corte. O consumo específico de combustível foi maior (P<0,05) na velocidade de 0,78 m.s⁻¹ do que na velocidade de 1,25 m.s⁻¹, porém não diferiu entre

a tração de um equipamento e outro. A maior capacidade de campo teórica foi de 0,54 ha.h⁻¹.

PALAVRAS-CHAVE: Projetos e construção, cultura do feijão, mecanização agrícola.

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the performance of two bean harvesters; the first is identified by having indented disk, and the second by having court of lamina. The project was realized in São João Farm (MG), Coimbra Country. The performance of the two equipment were compared evaluating: no extracted plants, damage loss, fuel consumption and theoretical field capacity. The beans used for this research was Ouro Negro type III. The tractor used to pull the harvesters was the VALMET 68 Cafeeiro, with 43 kW engine power, 1,120 mm of track, 0.78 m.s⁻¹ and two speeds of 1.25 m.s⁻¹. The data was analyzed using split plot design the harvesters in the parcels and the speeds of tractor in the sub parcels, with six repetitions. The statistical analysis showed that the number of no extracted plants were greater (P < 0.05) for indented disk harvester with 0.78 ms⁻¹ speed. The damage loss was significantly higher (P< 0.05) the equipment with court lamina was used. The specific fuel consumption was greater (P<0,05) in 0,78 m.s⁻¹ speed than 1.25 m.s⁻¹ within harvesters but not between harvesters. The greater theoretical field capacity was 0,54 ha.h⁻¹.

KEY WORDS: Design and Building, bean crop, mechanization of agriculture.

INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um produto agrícola com fonte nutritiva das mais ricas em proteína

¹ Eng. Agrícola, Prof. Efetivo, Depto. de Engenharia Rural, Centro de Ciências Agroveterinárias, UDESC, Lages, SC, (0xx49)2222100 – R:2211, e-mail: a2akn@cav.udesc.br

² Eng. Agrônomo Prof. Titular, Doutor, Depto. Engenharia Agrícola, UFV, Viçosa – MG.

³ Eng. Agrícola Prof. Doutor, Depto. de Engenharia Agrícola, UFV, Viçosa – MG.

⁴ Eng. Agrônomo Pesquisador, Doutor, EPAMIG, Uberaba – MG.

⁵ Eng. Agrônomo Prof. Doutor, Depto. Estatística, UFV, Viçosa – MG.

vegetal, 20 a 22 % do teor médio das sementes, além de ponderável fornecedor energético de 341 cal/100 g. O consumo per capita é de 18 kg/ano e a produtividade média brasileira é cerca de 500 kg/ha, e, de acordo com ARAÚJO et al. (1988), com aplicação de tecnologia o agricultor pode atingir de 1.200 a 1.800 kg/ha.

As melhores produções obtidas experimentalmente ocorrem quando são utilizados espaçamentos de 40 e 60 cm entre linhas e densidade de 10 a 15 plantas por metro linear. Para que seja obtida a população desejada é necessário que seja observado o poder germinativo da semente, fazendo correções se necessário, FARIA (1980).

Sabe-se que o feijão é bastante sensível a anormalidades climáticas e tal fato torna sua lavoura mais arriscada em comparação com a de outros grãos (WALDER et al., 1978). Os problemas referentes à colheita mecanizada do feijão, afetam o incremento da produção, devido ao grande risco da exposição prolongada do feijoeiro no campo por falta de mão-de-obra e de máquinas para executar esta operação. A colheita deve ser feita em um período mais curto possível, sem esperar que as vagens sequem em demasia no campo a fim de evitar perdas por debulha natural, além do risco da ocorrência de chuvas, o que causaria transtornos como a germinação das sementes dentro das vagens.

Uma das fases da colheita, o arranquio das plantas, ainda é realizada pela grande maioria dos agricultores manualmente, embora mais de 6.000.000 ha sejam cultivados com o feijoeiro no Brasil. Essa operação, além de ser um dos fatores que impede a expansão da cultura, onera o preço do produto, pois o gasto da mão-de-obra é elevado, POMPEU (1987).

A colheita mecanizada é imprescindível à expansão das áreas de cultivo do feijão. A transformação dessas áreas de exploração de subsistência em atividade empresarial é necessária ao desenvolvimento sócio-econômico e à crescente demanda por alimentos (SILVA, 1988). Essa colheita segue dois caminhos alternativos de acordo com SILVA et al. (1983):

- O primeiro é a obtenção de variedades com porte e inserção de vagens que possibilitem a utilização dos equipamentos tradicionalmente usados para a soja, arroz, etc.;

- O segundo é o desenvolvimento de equipamentos adaptáveis as atuais características da cultura.

Cerca de 50% das vagens do feijoeiro situam-se entre 5 e 10 cm acima do nível do solo, fora do alcance das ceifadoras convencionais, constituindo-se como um problema para a mecanização da colheita direta, SILVA et al. (1982).

Considerando-se que o feijoeiro não possui características morfológicas que o enquadrem como planta adaptada a colheita direta com automotriz, um dos fatores mais importantes a ser considerado é a escolha do cultivar, que deve apresentar porte ereto, alto com ângulo de ramificação fechado, ponto de inserção das primeiras

vagens elevado, maturação suficientemente uniforme e resistência ao acamamento (hábito de crescimento tipo II, com porte alto) (LOLLATO, 1989).

O feijoeiro com hábito de crescimento arbustivo indeterminado, talo ereto, sem tendência trepadora cujas ramas são curtas e continuam crescendo mesmo durante a fase de floração, é classificado segundo LOPES et al. (1985), como planta de feijão tipo II; já o tipo III apresenta hábito de crescimento prostrado indeterminado, ramificações bem desenvolvidas, altura superior às plantas dos tipos I e II e pode ter tendência trepadora. FAGERIA (1989) afirma que as culturas do tipo II são mais adaptadas à colheita mecânica que as do tipo III.

Normalmente, os agricultores realizam a colheita quando as vagens estão secas e grande parte das folhas caídas. A umidade das sementes nessa fase, encontra-se entre 17 a 22%. Depois desse ponto, ocorrem variações na umidade das sementes, devido ao equilíbrio de umidade que mantém com a umidade relativa do ar. SILVA et al. (1975) constataram que ocorre acentuada perda de qualidade nas sementes quando colhidas após este período.

De acordo com COSTA et al. (1971), a colheita pode ser manual, conjugada e mecanizada. Na colheita manual as plantas são arrancadas e enleiradas ou feitas mudas manualmente para secagem. O processo de arranquio é feito nas primeiras horas da manhã, quando as plantas estão úmidas, evitando a debulha das vagens. Após permanecerem no campo para secar, são levadas para o local de trilha. A colheita conjugada é o arranquio manual das plantas associado à trilha mecânica. As principais formas de colheita conjugada possíveis de serem realizadas com máquinas segundo LOLLATO (1989) são as seguintes:

- arranquio manual e trilha com trilhadoras estacionárias,

- arranquio manual e trilha com automotrizes estacionárias

- arranquio manual ou mecânico e trilha com recolhedoras-batedoras ou automotrizes.

A colheita mecanizada é realizada diretamente com automotrizes. Embora seja o processo ideal para a cultura do feijão, os problemas inerentes a ela ainda não foram solucionados, por isto é necessário o corte das plantas seguindo de um período de cura no campo, para que se processe a secagem até o ponto em que a trilhagem possa ser feita com facilidade e eficiência (MENEZES & RIGITANO, 1972).

No Brasil, em virtude dos problemas inerentes à cultura, da inexistência de uma linha de produção de equipamentos específicos e adequados para cortar ou arrancar e enleirar as plantas de feijão e em razão também da inviabilidade de uso de colhedoras convencionais, a mecanização da colheita dessa leguminosa tem sido realizada mais intensamente nas operações de recolhimento e trilha (SILVA, 1988).

Conforme CANO e GARCIA (1990), existem dois

tipos de equipamentos empregados para o arranquio mecanizado: os que utilizam lâminas de corte e os de segas circulares, sendo mais freqüente o emprego dos primeiros, por serem mais simples e de menor custo.

Segundo LOLLATO (1989), o corte das plantas ao nível do solo, por cortadores adaptados à frente de tratores, é uma técnica utilizada há algum tempo em outros países. No Brasil, esse equipamento foi fabricado e comercializado, não tendo obtido o sucesso e a adoção esperados, em razão do relevo acentuado da maioria das regiões produtoras, das limitações de treinamento de operadores, da textura e falta de preparo do solo e da presença de ervas daninhas.

Visando mecanizar a colheita do feijão, OLIVEIRA E CASTRO (1982) realizaram testes no município de Caturai - GO, com equipamentos destinados às operações de corte/arranquio e enleiramento utilizando a variedade "Jalo". Após a avaliação dos resultados do equipamento, constatou-se que as perdas devidas a essas operações foram relativamente baixas, em torno de 5%.

De acordo com AIDAI et al. (1982), para o bom aproveitamento da colheita mecanizada, deve-se, ainda, levar em consideração outros aspectos, tais como:

- preparar bem o solo;
- evitar, no plantio, a formação de sulcos profundos pelos discos de plantadoras;
- não utilizar cultivador como prática cultural; e
- a umidade dos grãos na colheita não deve ser inferior a 16%, sob risco de aumentar a percentagem de danificações dos mesmos.

No período de 1989 a 1991, SILVA & BEVITORI (1994) realizaram ensaios em Goiânia e em Paracatu, com as colhedoras Ford New Holland e Maxion; e no Projeto Formoso (TO), com a For New Holland, chegando a obter perdas totais de grãos em torno de 10%.

Em 1958, foi desenvolvido em Michigan, EUA, um cortador com segas circulares, que obteve sucesso na colheita de feijão. A máquina consistia, basicamente, de dois discos horizontais recortados girando em direções contrárias, acionadas por motor hidráulico, cada um cortando uma linha e formando uma única leira. A planta não era agitada vigorosamente e não houve danificação dos grãos, desde que as vagens do feijão não estivessem excessivamente secas, McCOLLY (1958).

NAGAOKA (1995) desenvolveu e avaliou o desempenho de duas cortadoras-arrancadoras de feijão acoplado no sistema hidráulico de três pontos traseiro do trator e concluiu que para velocidade de $0,78 \text{ m.s}^{-1}$, o equipamento dotado com órgãos ativos de lâminas de corte ofereceu melhores resultados e para velocidade de $1,25 \text{ m.s}^{-1}$ o equipamento com órgãos ativos de discos recortados ofereceu os melhores resultados. MOREIRA et al. (1999) também avaliaram o desempenho de um protótipo de um cortador/enleirador de feijão, porém, acoplado na dianteira do trator. Os autores concluíram que as velocidades de $0,73 \text{ m.s}^{-1}$ e $1,17 \text{ m.s}^{-1}$ foram ideais para

o bom desempenho do protótipo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de duas cortadoras-arrancadoras de feijão: com discos recortados (CAF1) e com lâminas de corte (CAF2), em condições de campo, com base na eficiência e eficácia de corte e arranquio, na velocidade da máquina e nas perdas de grãos do cultivar de feijão Ouro Negro do tipo III.

MATERIAL E MÉTODOS

Os equipamentos utilizados nos ensaios foram desenvolvidos na Universidade Federal de Viçosa, no Laboratório de Mecanização Agrícola do Departamento de Engenharia Agrícola, na tentativa de minimizar os problemas da cultura do feijão na época da colheita.

Para avaliação dos equipamentos, utilizou-se uma área situada na fazenda São João, em Coimbra, MG, com aproximadamente 0,1 ha. O cultivar plantado foi o Ouro Negro, com hábito de crescimento indeterminado do tipo III. Foram utilizadas neste experimento 48 fileiras de 20 m, com espaçamento entre linhas de 0,5 m. A população final foi de 193.000 plantas por ha.

O solo foi classificado como Argisolo Amarelo Distrófico Câmbico fase terraço, textura argilosa e o teor médio de água do solo foi de 27,7 %, apresentou índice de cone de 1.957 kPa, enquanto a umidade do grão foi de 18,6 %.

Os ensaios foram realizados, utilizando-se um trator cafeeiro 4 x 2, marca VALMET, modelo 68, com potência nominal de 43 kW no motor, a 2.300 rpm. A rotação do motor utilizada foi de 1.600 rpm e a bitola, fixada em 1.120 mm (Figura 1).



Figura 1: Vista lateral do trator e abridores de linhas, utilizados no ensaio dos equipamentos.

Os equipamentos foram acoplados no sistema hidráulico de três pontos do trator, enquanto os abridores de linhas foram fixados na frente de cada roda do trator, com mecanismos de levantamento mecânico e individual (Figura 2, 3 e 4).

O corte e o arranquio dos feijoeiros foram realizados com duas velocidades do trator: V1, na 1ª marcha reduzida (1L), a 0,78 m.s⁻¹; e V2, na 2ª marcha reduzida (2L), a 1,25 m.s⁻¹.

Avaliação da População Final

Para determinar a população final foram sorteadas, aleatoriamente, 20 linhas de cada área, cujos pontos de coleta também foram sorteados com uma linha fixa de um metro linear cada ponto, de modo que a somatória de todos os pontos corresponderia a uma linha de 20 metros lineares. Em cada ponto foi contado o número de plantas por metro, o qual, com a média desses valores, foi transformado em plantas por hectare, pela seguinte fórmula:

$$\text{População Final(pl/ha)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ plantas/m} \times 10.000}{\text{espaçamento (m)}} \dots\dots(1)$$

Medição das Plantas Não Arrancadas

Consideraram-se plantas não arrancadas as que não foram totalmente retiradas do perfil do solo pelo equipamento. A contagem foi realizada por duas pessoas, logo após a passagem do equipamento, uma em cada linha, levantando-se a planta para verificação do arranquio.

As porcentagens das plantas não arrancadas foram calculadas pela seguinte expressão:

$$\text{Plan. não arranc.(\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ plan não arranc.}}{\text{população final}} \times 100 \dots\dots(2)$$

Avaliação das Perdas Por Danos

Para avaliar as perdas por danos, foram contadas as plantas que tiveram os ramos quebrados, as vagens abertas, amassamento e corte da parte aérea juntamente com os grãos.

Foram avaliadas as porcentagens de perdas por danos, pela seguinte expressão:

$$\text{Perdas por danos} = \frac{\text{n}^\circ \text{ plan. perdidas}}{\text{há}} \times 100 \dots\dots(3)$$

população Final

Medição do Consumo de Combustível

O consumo de combustível foi determinado por meio de um medidor de combustível, que foi construído no Laboratório de Mecanização Agrícola do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV. O consumo específico de combustível, em litros/ha, foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Cons. comb. (kg.ha}^{-1}\text{)} = \frac{\text{consumo horário(g.h}^{-1}\text{)} \dots\dots(4)}{1.000 \times \text{CcE(ha.h}^{-1}\text{)}}$$

em que:

CcE = capacidade de campo efetiva, em ha/h.

Umidade do Grão

Coletaram-se da área experimental, em pontos escolhidos aleatoriamente, durante a execução do arranquio, cerca de 2 kg de grãos, que foram acondicionados em sacos plásticos e levados imediatamente para o laboratório, onde foi determinada a umidade do grão, com base úmida, pelo método da estufa com ventilação, a 103 ± 2°C, durante 72 horas.

Análise Granulométrica e Umidade do Solo

Antes de se fazerem os testes, foram coletadas amostras de solo em cinco pontos por área experimental, estratificados de 0 a 5 cm e de 5 a 10 cm de profundidade. As amostras foram coletadas com o auxílio de um enxadão e colocadas em latinhas de alumínio, com identificação, as quais foram transportadas imediatamente para o Laboratório de Física do solo, onde foram realizadas as análises granulométricas do solo e a análise da umidade atual do solo, seguindo-se a metodologia da EMBRAPA (1979).

Determinação do Índice de Cone

Para determinar o Índice de Cone, foi utilizado um penetrógrafo da marca SOIL CONTROL, modelo SC-60, com uma haste de 600 mm de comprimento e um cone de 130 mm² de área de base (12,83 mm de diâmetro) e 30 graus de ângulo de vértice. As determinações foram realizadas ao lado do ponto de coleta das amostras, que foram utilizadas para determinações de granulometria e umidade, na profundidade de 0 a 10 cm.

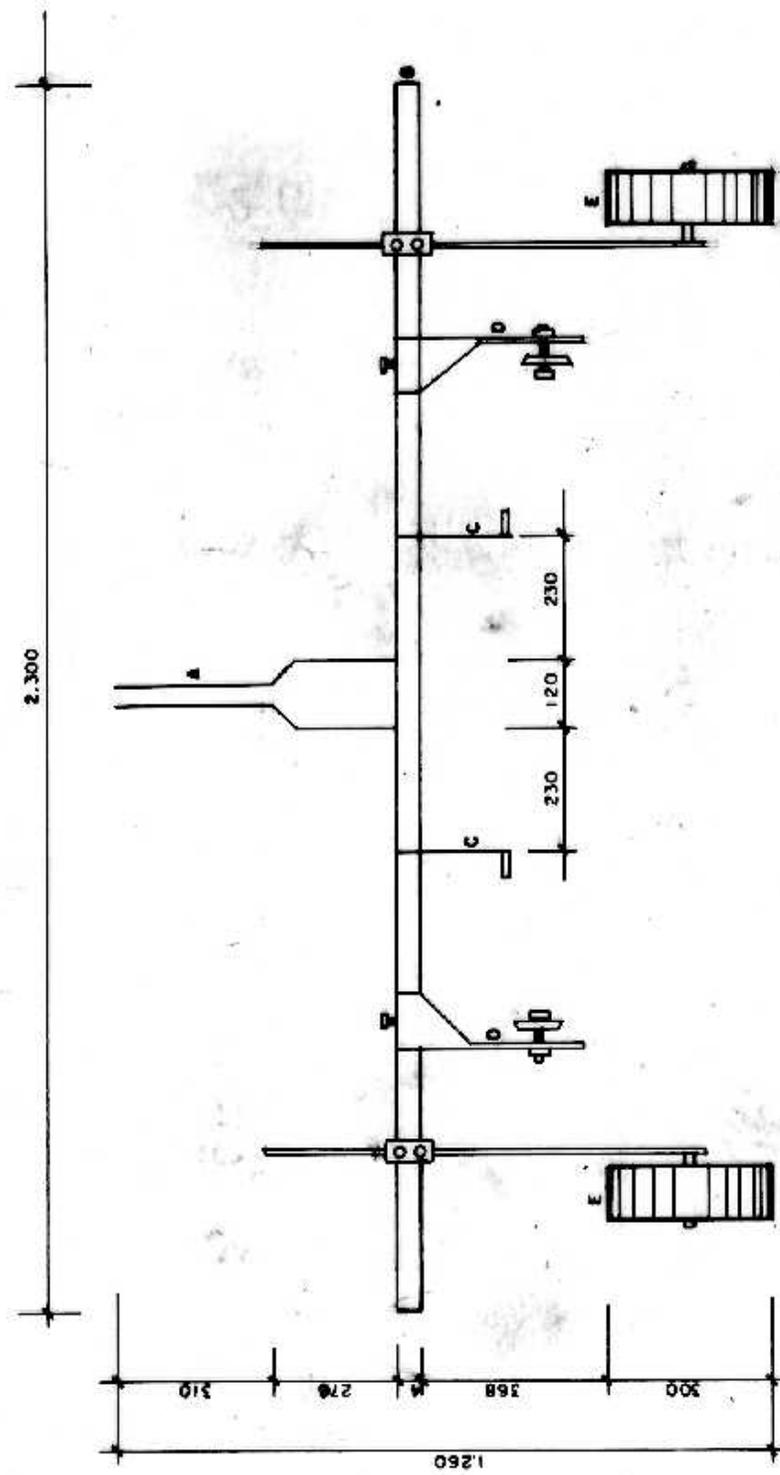


Figura 2: Barra porta-ferramentas utilizado para fixação dos órgãos ativos do equipamento.

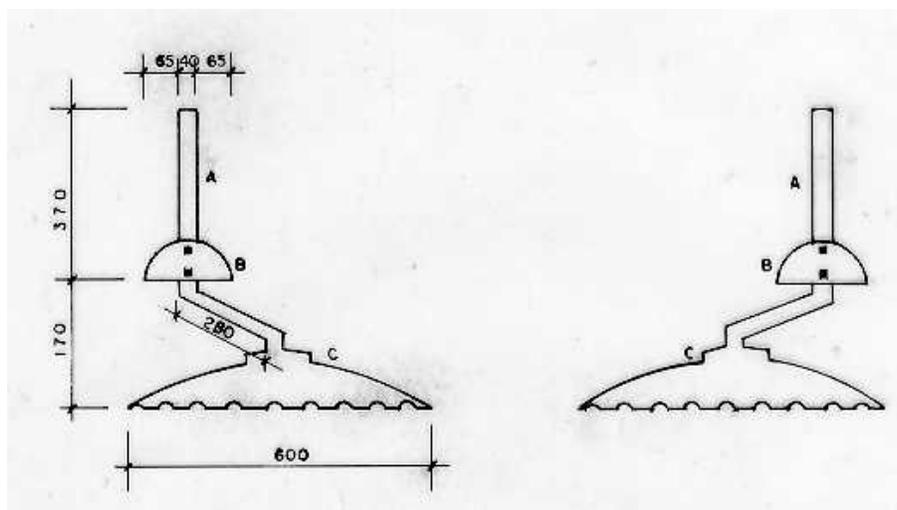


Figura 3: Órgãos ativos do equipamento CAF1, com discos recortados

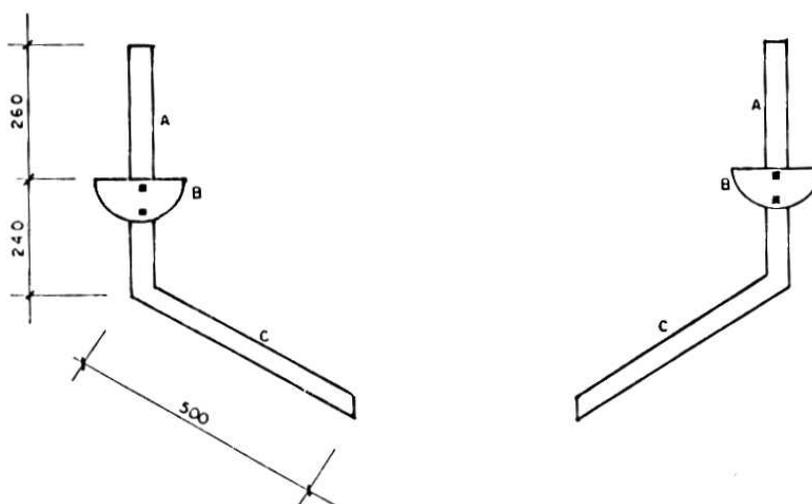


Figura 4: Órgãos ativos do equipamento CAF2, com lâminas de corte

Os valores registrados pelo penetrógrafo, em $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$, foram multiplicados pelo fator 98,1, para se obter a pressão no sistema Internacional de Unidades de Medidas em kPa.

Capacidade de Campo Efetiva

a) Arranquio mecânico

A capacidade de campo efetiva do arranquio mecânico foi calculada pela seguinte expressão:

$$CcE = \frac{V \times Lu}{10}$$

em que

CcE = capacidade de campo efetiva, em $\text{ha}\cdot\text{h}^{-1}$;

v = velocidade, em $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$; e

Lu = largura útil do equipamento, em m.

b) Arranquio manual

Para determinação da capacidade de campo teórica do arranquio manual, foi cronometrado o tempo de arranquio de quatro linhas de 20 m por homem. Após sua determinação, a capacidade de campo teórica foi substituída na expressão anterior.

Análise Estatística

As variáveis foram analisadas, considerando-se o

delineamento experimental em blocos ao acaso, no esquema de parcelas subdivididas, e tendo na parcela os equipamentos (CAF1 e CAF2) e na subparcela as velocidades do trator (V1 e V2), com seis repetições. Para os dados das plantas não arrancadas e perdas por danos houve a necessidade de fazer a transformação $(X + 0,5)^{0,5}$.

Os resultados foram interpretados estatisticamente, por meio da análise de variância, adotando-se o nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que o número de plantas não arrancadas apresentou efeitos significativos da interação velocidade x equipamento e o consumo de combustível foram influenciados apenas pelas velocidades V1 e V2 (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância dos dados de plantas não arrancadas e consumo de combustível.

FV	Quadrados Médios	
	Plant. não arranc. ¹	Consumo
Bloco	9,21	2,62
Equipamento (CAF)	1,17	35,04
Resíduo (a)	2,79	9,84
Velocidade (V)	2,24	513,37**
V x CAF	33,44*	2,67
Resíduo (b)	4,02	6,10

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

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

¹ Dados transformados em $(X+0,5)^{0,5}$

Na Tabela 2, apresentou-se a comparação das médias desses efeitos. Verificou-se, nessa Tabela, que para as condições em que os equipamentos foram ensaiados, o número de plantas não arrancadas foi maior para o equipamento CAF1 do que no CAF2, quando foi utilizada a velocidade V1. Tal diferença pode estar relacionada com o princípio de corte dos órgãos ativos, em que as lâminas cortam pressionando contra o solo e os discos recortados trabalham com movimentos de rotação.

Tabela 2. Valores transformados de plantas não arrancadas/40 m, na tração dos equipamentos em diferentes velocidades ($m.s^{-1}$).

Equipamentos	Velocidades	
	1L(0,78 $m.s^{-1}$)	2L(1,25 $m.s^{-1}$)
CAF1	4,53 aA	1,56 aB
CAF2	1,722 bA	3,47 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula, para cada coluna, e da mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A Figura 5 apresenta o número de plantas perdidas por 40 m de cada equipamento, nas velocidades V1 e V2. Neste caso, a perda por danos pelo equipamento CAF1 foi zero e pelo equipamento CAF2, maior que pelo equipamento CAF1, com velocidade V1 e V2 que foram, respectivamente, de 0,22 e 1,14 planta por 40 m. Isso ocorreu porque no disco recortado (CAF1), ocorre movimento de giro, penetrando mais facilmente no solo, proporcionando melhor enleiramento e menor injúria das plantas nas condições em que foram avaliadas.

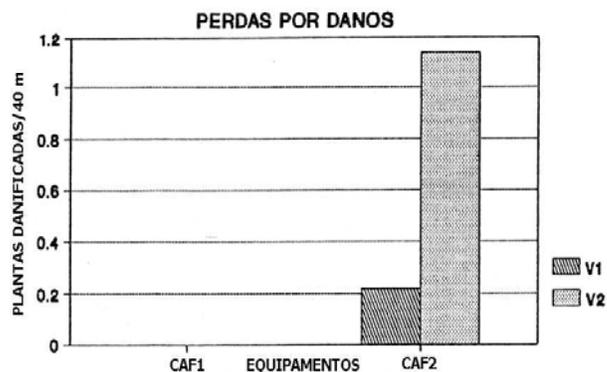


FIGURA 5: Perdas por danos para os equipamentos CAF1 e CAF2 nas velocidades V1 e V2.

Na Tabela 3 observou-se que os valores médios de plantas não arrancadas e as perdas por danos foram menores que os resultados encontrados por OLIVEIRA & CASTRO (1982) e SILVA & BEVITORI (1994), quando avaliaram máquinas e implementos destinados às operações de corte/arranquio, enleiramento e trilha.

Tabela 3. Valores médios das plantas não arrancadas e perdas por danos para cada equipamento, em porcentagem.

Plantas	CAF1	CAF2
Não arrancadas	3,73 %	3,09 %
Perdidas/Danos	0,00 %	0,21 %

Na Tabela 4, verificou-se que a média do consumo de combustível da velocidade V1(10,92 kg.ha⁻¹) foi maior do que a média do consumo da velocidade V2(7,61 kg.ha⁻¹). Houve aumento da velocidade do trator e, como o esforço de tração exigida pelos equipamentos foi relativamente baixo, o consumo por ha reduziu-se.

Tabela 4. Valores médios do consumo de combustível do trator em kg/ha de acordo com a velocidade de trabalho (m.s⁻¹)

Velocidades (m.s ⁻¹)	Equipamentos		Média
	CAF1	CAF2	
0,75	11,47	10,37	10,92 a
1,25	7,92	7,29	7,61 b

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Na tabela 5, observou-se que os valores da capacidade de campo teórica dos arranquios mecânico e manual. Nas condições em que foram realizados os ensaios, o trabalho executado pelos equipamentos com velocidade (0,78 m.s⁻¹) corresponde a 9,65 horas-homem executando o arranquio manual, enquanto com velocidade V2 (1,25 m.s⁻¹) corresponde a 15,5 horas-homem.

Tabela 5. Velocidade e capacidade de campo teórica dos arranquios mecânico e manual.

Arranquio	Velocidade (km.h ⁻¹)	CcT (ha.h ⁻¹)
Mecânico	2,8	0,280
Mecânico	4,5	0,450
Manual	0,2	0,029

CONCLUSÃO

O número de plantas não arrancadas foi maior para o equipamento CAF1 na velocidade de 0,78 m.s⁻¹, cuja média destransformada foi de 20,02 plantas por 40 m (5,19% das plantas); e menor para o equipamento CAF2 a 1,25 m.s⁻¹, cuja média destransformada foi de 1,93 planta por 40 m (0,5% das plantas).

A perda por danos foi maior com o equipamento CAF2 (0,21%) e menor com o Equipamento CAF1 (0,00%).

Caso a velocidade do trator seja equivalente ao da primeira reduzida, recomenda-se a lâmina de corte (CAF2) como órgão ativo, pela simplicidade, menor custo e por poucas perdas por danos, enquanto para velocidade de 1,25 m.s⁻¹ (4,5 km.h⁻¹) os discos de corte (CAF2) são mais recomendados, pois, além de proporcionarem bom arranquio, causaram menores perdas por danos das plantas.

O consumo específico de combustível na 2^a reduzida foi menor do que na 1^a reduzida, ou seja 7,61 kg.ha⁻¹. Entre os equipamentos, não houve diferença no consumo de combustível do motor.

Os equipamentos avaliados permitem reduzir os riscos de perdas provocadas pelas chuvas na ocasião da colheita do feijão, ganho de tempo, redução do problema da falta de mão-de-obra durante a colheita e pode reduzir o custo da colheita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAIR, E.T.; CASTRO, E.T.; SILVA, C. C.; FONSECA, J. A.; CARNEIRO, J. E. S.; FAGUNDES, S.A.; COSTA, J.A.P. Desenvolvimento de tecnologias para a colheita mecanizada do feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) no sistema de cultivo "solteiro". In: FEIJÃO: resumos informativos. Brasília: EMBRAPA/CNPAP, 1982. p.46.

ARAÚJO, G.A.A.; VIEIRA, C; VIEIRA, R.F.; CHAGAS, J.M. Feijão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.14, n.163, p.73-76, 1988.

CANO, O.; GARCIA, F. Arrancador frontal de frijoles AF-4.2. **Ci Tecnol. Agri. Mecaniz.** La Habana, v.13, n1-2, p.77-86, 1990.

COSTA, J.G.C.; ANTUNES, I.F.; SIQUEIRA, O.; STRINGARI, S.J.; XAVIER, F.E. Aspectos gerais da produção de feijão no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1, 1971, Campinas. Anais... Campinas: Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, 1971. 23p.

EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. **Manual de métodos de análise de**

solos. Rio de Janeiro, 1979. s.n.p.

FAGERIA, N.K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas.** Brasília: EMBRAPA/CNPAP, 1989. 424p.

FARIA, R.T. Espaçamento e densidade. In: CULTURA do feijão no Estado do Paraná. Londrina, IAPAR, 1980. 73p. (Circular IAPAR, 18).

LOLLATO, M. A. Colheita, processamento e armazenamento. In: O FEIJÃO no Paraná. Londrina, IAPAR, 1989. p.281-303. (Circular, IAPAR, 63).

LOPES, M.; FERNANDES, F.; VAN SCHBONHOVEN, A. **FRIJOL: investigación y producción.** Cali, PNUD/CIAT, 1985. 420 p.

McCOLLY, H.F. Harvesting edible beans in Michigan. **Transaction of the ASAE.** St. Joseph, v.1, n.1, p.68-75, 1958.

MENEZES, J.F.; RIGITANO, A. Alguns aspectos da mecanização das operações na cultura do feijão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1, 1971, Campinas. **Anais...** Campinas, Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, 1972. p. 397-416.

MOREIRA, R.F., FERNANDES, H. C.; DIAS, G.P. Desenvolvimento e avaliação do desempenho de um protótipo cortador/enleirador na colheita de feijão. **Eng. Agríc.**, v.18, n.3,p.22-33, 1999.

NAGAOKA, A. K. **Desenvolvimento de dois tipos de cortadoras-arrancadoras de feijão e avaliação de seus desempenhos em cultivar com crescimento do tipo III.** 1995. 51 f. Dissertação (Magister Scientiae em Engenharia Agrícola/Mecanização Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa.

OLIVEIRA, E.T.; CASTRO, T.A.P. Comportamento de alguns equipamentos utilizados na colheita de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no sistema de cultivo "solteiro". In FEIJÃO: resumos informativos, 1982 Brasília, **Anais...** Brasília: EMBRAPA/CNPAP, 1982. p.46.

POMPEU, A.S. Melhoramento do feijoeiro. In: FEIJÃO, fatores de produção e qualidade. Campinas: Fundação Cargil, 1987. p. 1-28.

SILVA, C. C.; BEVITORI, R. Colheita e beneficiamento de feijão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n. 178, p.63-65, 1994.

SILVA, J.G.; CONTO, A. J.; GUAZZELLI, R.J.; FONSECA, J.R. Colheita mecanizada do feijão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.8, n.90, p.48-54, 1982.

SILVA, J. G; FONSECA, J. R.; CONTO, A. J. A colheita mecanizada do feijão no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.9, n.103, p.40-42, 1983.

SILVA, J.G. Colheita mecânica. In: ZIMMERMANN, M. J. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T., ed. **Cultura do feijoeiro, fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba, POTAFOS, 1988. p. 345 – 356.

SILVA, C. M.; VIEIRA, C.; SEDIYAMA, C.S. Determinação da época adequada de colheita de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com base na qualidade fisiológica das sementes. **Revista Ceres**, Viçosa, v.22 n.122, p.272-81, 1975.

WALDER, V.M.; WALDER, V.L.M.S. **Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no Espírito Santo: comportamento e tendências.** Vitória, s.n., 1978. 75 p.

ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FASES SÓLIDA E LÍQUIDA DE UM SOLO ÁCIDO PELA APLICAÇÃO DE CALCÁRIO E GESSO AGRÍCOLA

ALTERATION ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE SOLID AND LIQUID PHASES OF AN ACID SOIL BY LIME AND GYPSUM APPLICATION

Hatila Julião de Oliveira¹; Paulo Roberto Ernani²; Cassandro Vidal Talamini do Amarante³

RESUMO

A disponibilidade de Ca no solo depende da atividade na solução e da capacidade da fase sólida restabelecer a concentração na solução à medida que as plantas o absorvem, e essas características são afetadas pelo solo e pelas fontes de Ca. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de calcário ou de gesso agrícola no aumento das formas de Ca no solo e nas propriedades químicas relacionadas com a acidez e com a disponibilidade de Ca aos vegetais. Doses de calcário dolomítico (0, 3, 6, 9, 12 e 18 Mg ha⁻¹) ou de gesso agrícola (0, 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹) foram aplicadas em amostras de um Cambissolo Húmico, que a seguir foram incubadas durante três meses na temperatura ambiente. Ao final desse período, efetuaram-se várias determinações químicas nas fases sólida e líquida do solo e calcularam-se os coeficientes de seletividade entre os cátions. A calagem aumentou o pH e os teores de Ca e Mg trocáveis e solúveis, diminuiu o Al nas duas fases, e o K na fase líquida. A adição de gesso não afetou o pH e aumentou o Ca trocável e a concentração de todos os cátions (Ca, Mg, K e Al) na fase líquida.

O gesso, mesmo tendo menos Ca que o calcário, foi o produto que mais aumentou o Ca solúvel e, por isso, pode ser uma boa alternativa para suprir esse nutriente em situações onde haja necessidade de alta concentração na solução e/ou alta mobilização no perfil. A preferência dos cátions pelas cargas negativas, no solo calcariado, seguiu a ordem: Al > Ca > Mg > K; nos tratamentos com gesso, a preferência variou com a dose e, para alguns nutrientes, o comportamento foi o oposto daquele verificado com a calagem.

PALAVRAS-CHAVE: calagem, sulfato de cálcio, seletividade, cátions solúveis, cátions trocáveis.

SUMMARY

Soil Ca availability depends on both the concentration of Ca in the soil solution and the capability

of the solid phase to keep Ca activity unaffected as plant uptake takes place, and these parameters are affected by the Ca source. This study was carried out to quantify the effect of lime or gypsum application on soil parameters related to acidity with emphasis on Ca. Rates of dolomitic lime (0, 3, 6, 9, 12 and 18 Mg ha⁻¹) or agricultural gypsum (0, 3, 6, 9 and 12 Mg ha⁻¹) were applied to samples of a very acid soil (Haplumbrept) then incubated for three months at room temperature. After incubation, some chemical determinations were performed in the solid and liquid phases, and the selectivity coefficients between cations were calculated. Lime increased pH and the exchangeable and soluble values of Ca and Mg, decreased Al in both phases and the soluble K. Addition of gypsum had no effect on soil pH, but increased the exchangeable Ca and the concentration of Ca, Mg, Al and K in the liquid phase. Gypsum was the product that most increased solution Ca despite having lower content of Ca than lime. Thus, gypsum can be a good choice for Ca supplying where high values of Ca in solution are needed or when is required a rapid downward movement of Ca in the profile. Cation preference for the negative charges in the limed soil followed the order: Al > Ca > Mg > K; in the samples that received gypsum, the preference varied with the rate applied and for some cations the behavior was opposite of that verified on limed samples.

KEY-WORDS: liming, calcium sulfate, selectivity, exchangeable cations, soluble cations.

INTRODUÇÃO

Em algumas espécies vegetais como macieira, ameixeira, tomateiro, pereira, etc, a deficiência de cálcio (Ca) pode causar vários distúrbios fisiológicos nos frutos, que depreciam a qualidade e inviabilizam a comercialização (SHEAR, 1975). Em macieiras, o suprimento inadequado de Ca favorece o aparecimento principalmente de "bitter pit" e depressão lenticelar (HEWETT & WATKINS, 1991; ARGENTA & SUZUKI, 1994). Frutos com "bitter pit" apresentam manchas

¹ Eng. Agr., M. Sc. em Solos.

² Eng. Agr., Ph.D., professor do Departamento de Solos da UDESC. Caixa Postal 281, CEP 88520-000, Lages (SC). Bolsista do CNPq. E-mail:premani@cav.udesc.br

³ Eng. Agr., Ph.D., professor do Departamento de Fitotecnica da UDESC. E-mail:a2cvta@cav.udesc.br

pequenas e escuras na epiderme, e as células que estão abaixo apresentam perda do conteúdo citoplasmático, tornando o tecido corticoso.

Mesmo em solos bem supridos em Ca, apesar da maior quantidade desse nutriente ser suprida aos frutos a partir do solo, normalmente há necessidade de suplementações através de pulverizações foliares em pré-colheita (ERNANI et al., 2001a). A necessidade de pulverizações varia na razão inversa da disponibilidade de Ca no solo, a qual depende principalmente do material de origem e grau de intemperização do solo, pH, e das relações quantitativas entre o Ca e outros cátions, principalmente, K, Mg e NH_4 .

A calagem é a forma mais fácil e barata de aumentar a concentração de Ca no solo, pois os calcários comerciais possuem, em média, 25 a 40 % de Ca. Além de fornecer Ca, a calagem supre Mg, diminui ou elimina o Al tóxico, eleva o pH, e com isso aumenta as cargas elétricas negativas (PAVAN, 1983; ALBUQUERQUE et al., 2000), principalmente em solos com predomínio de cargas variáveis. Devido ao aumento das cargas elétricas e a permanência de poucos ânions na solução, a quase totalidade do Ca aplicado pelo calcário liga-se a elas (ERNANI et al., 2001b) e somente uma pequena quantidade permanece na solução do solo.

O gesso agrícola ($\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) também pode ser usado para suprir Ca ao solo, o qual possui aproximadamente 17 a 20% de Ca. Diferentemente do calcário, o gesso não altera o pH e as cargas elétricas do solo (ERNANI et al., 2001a) e, por isso, grande parte do Ca aplicado permanece na solução do solo, enquanto outra parte vai para as cargas negativas, de onde desloca outros cátions para a solução (ERNANI & BARBER, 1993; ERNANI et al., 2001b). Como o gesso também mantém o ânion sulfato na solução, a mobilidade do Ca no perfil do solo é muito maior quando aplicado via gesso do que via calcário (ERNANI, 1986).

A camada arável costuma ser a única parte do solo que é corrigida em termos de acidez e fertilidade para o cultivo de espécies, pois a operação de lavração profunda é dispendiosa (SUMNER et al., 1986). Assim, a utilização de gesso pode favorecer o desenvolvimento de raízes em profundidades abaixo da camada corrigida pela calagem (PAVAN et al., 1987; NOBLE et al., 1988). Esse maior desenvolvimento de raízes provavelmente ocorre devido à diminuição da toxicidade do Al pela formação do par iônico $\text{Al}(\text{SO}_4)^+$. No caso específico de fruteiras, mais especificamente de macieiras, a maior concentração de Ca proporcionada pelo gesso na solução do solo, tanto na camada arável quanto no subsolo, pode favorecer a absorção de Ca (PAVAN et al., 1987).

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de doses de calcário ou de gesso agrícola sobre as propriedades químicas relacionadas com a acidez em um Cambissolo Húmico Ácido.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido em laboratório, no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages, SC, em 1999.

Os tratamentos consistiram da aplicação de quantidades de calcário dolomítico (em doses equivalentes a 0, 3, 6, 9, 12 e 18 Mg ha^{-1} , ajustadas para PRNT 100%) ou de gesso agrícola (em quantidades equivalentes a 0, 3, 6, 9 e 12 Mg ha^{-1}) a unidades experimentais com 2,0 kg de solo (base seca). Utilizaram-se amostras de solo coletadas na camada de 0 – 20 cm de um Cambissolo Húmico, no município de Urubici, no Planalto Sul de Santa Catarina, que tinha 6,5% de matéria orgânica, pH 3,93, $\text{Al}=5,4 \text{ cmolc kg}^{-1}$, e uma necessidade de 9,0 t ha^{-1} de calcário para elevar o pH para 6,0. O calcário possuía 19% de Ca e 12% de Mg, e o gesso tinha 16% de Ca, e ambos foram aplicados secos. O experimento foi conduzido no delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições.

Após a aplicação dos tratamentos, as unidades experimentais foram umedecidas com água destilada até 80% da umidade retida na capacidade de campo, e incubadas dentro de sacos de polietileno, na temperatura ambiente. Após três meses, coletaram-se amostras de solo, as quais foram secadas a 60°C, durante três dias, e nelas determinou-se pH- H_2O , condutividade elétrica, e a concentração de Ca, Mg, K e Al trocáveis e solúveis em água destilada, e calcularam-se os coeficientes de seletividade entre os cátions.

O pH- H_2O foi determinado na relação solo/solvente de 1:1 e o pH-SMP na relação solo/água/solução SMP de 1:1:0,5; Ca, Mg e Al trocáveis foram extraídos com solução de KCl 1 mol L^{-1} e K com solução de ácidos diluídos (HCl 0,05 mol L^{-1} + H_2SO_4 0,025 mol L^{-1}). As quantidades solúveis de Ca, Mg, K e Al foram determinadas em extratos líquidos obtidos pela mistura de quantidades iguais de solo e água destilada (50 cm^3), seguida por agitação mecânica durante 15 minutos e decantação por uma noite. No dia seguinte, os extratos foram separados da fase sólida por sucção, em funis de Buchmann. Nas duas fases, Ca, Mg e Al foram determinados por espectrofotometria de emissão induzida por plasma e K por espectrofotometria de chama. A condutividade elétrica foi determinada nos extratos líquidos através de condutivimetria.

Os coeficientes de seletividade para os cátions foram calculados a partir de suas concentrações nas cargas negativas e na solução de equilíbrio, usando o programa Soil Solution (WOLT, 1987).

Os dados foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Para os valores de Ca e Mg nas frações trocável e solúvel, decorrentes da aplicação de doses crescentes de calcário e

gesso, usou-se regressão polinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos no Ca e Mg

A aplicação de calcário aumentou na mesma magnitude as concentrações de Ca e Mg trocáveis (Figura 1). O Ca aumentou de 1,39 $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$, no solo sem calcário, para 5,4 $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ onde se aplicou a dose recomendada pelo método SMP para elevar o pH a 6,0 (9 Mg ha^{-1}), enquanto o Mg aumentou de 0,5 para 5,0 $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ nesses mesmos tratamentos. Empiricamente, recomenda-se que o solo tenha uma relação Ca:Mg de 3:1 a 4:1; na prática, entretanto, relações Ca:Mg desde 1:1 até 10:1 não têm influenciado o rendimento das culturas.

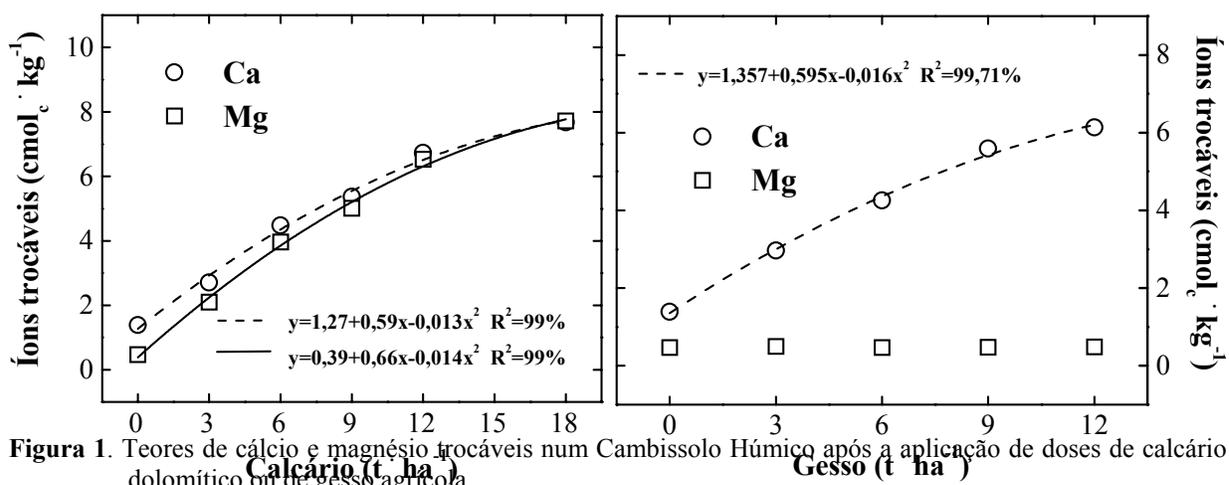


Figura 1. Teores de cálcio e magnésio trocáveis num Cambissolo Húmico após a aplicação de doses de calcário dolomítico ou de gesso agrícola.

Como precaução, não se deve permitir que o Mg seja maior que o Ca, em $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$.

Os valores trocáveis desses dois cátions aumentaram em conformidade com a teoria. Considerando um incremento linear para os dois nutrientes na faixa de 0 a $9,0 \text{ Mg ha}^{-1}$, houve um aumento de $1,0 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ de Ca+Mg para cada tonelada de calcário aplicada, o que está de acordo com os cálculos estequiométricos quando se considera calcário com valor de neutralização de 100% e uma camada de solo corrigida com 17 a 20 cm de profundidade, que possui aproximadamente de $2.000 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$.

A calagem proporcionou um aumento pequeno nas concentrações de Ca e Mg solúveis, com maior magnitude para o Mg. O Ca extraível com água destilada, aqui denominado de solúvel, aumentou de $0,16 \text{ cmol}_c \text{ L}^{-1}$ (32 mg L^{-1}) no solo sem calcário, para $0,27 \text{ cmol}_c \text{ L}^{-1}$ (54 mg L^{-1}) onde se aplicou $9,0 \text{ Mg ha}^{-1}$; nesses mesmos tratamentos, o Mg aumentou de $0,09 \text{ cmol}_c \text{ L}^{-1}$ (11 mg L^{-1}) para $0,38 \text{ cmol}_c \text{ L}^{-1}$ (46 mg L^{-1}) (Figura 2). Esses valores mostram que menos de 1% do Ca e de 2% do Mg aplicados pelo calcário foram para a solução. O maior incremento no Mg solúvel se deve à sua menor energia de ligação com as cargas negativas da fase sólida do solo relativamente ao Ca,

como pode ser visto pelos coeficientes de seletividade entre esses dois cátions (Tabela 2), uma vez que o Mg possui um raio hidratado maior que o do Ca. Esse incremento diferencial na solução do solo pode ter conseqüências na disponibilidade aos vegetais, como será discutido posteriormente.

A aplicação de gesso agrícola ao solo aumentou a concentração de Ca na fase trocável, a qual passou de $1,39 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ (280 mg kg^{-1}) no tratamento sem gesso, para de $5,59 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ (1120 mg kg^{-1}) naquele que recebeu $9,0 \text{ Mg ha}^{-1}$, mas não alterou a concentração de Mg (Figura 1). Isso ocorreu porque o gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) não possui Mg em sua composição. Sendo assim, ele pode ser utilizado como fonte de Ca para aumentar a relação Ca:Mg em solos onde ela esteja muito baixa e não se pretenda elevar o pH. Cada tonelada de gesso aplicado aumentou o Ca trocável em aproximadamente $0,4 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ (80 mg kg^{-1}), o que corresponde a $160 \text{ kg de Ca ha}^{-1}$, e reflete a composição do gesso que possui 16% de Ca. Em condições de lavoura, esse aumento será aproximadamente 25 a 30% menor, uma vez que esse é o percentual de umidade média no gesso, e o produto aplicado no presente trabalho estava completamente seco.

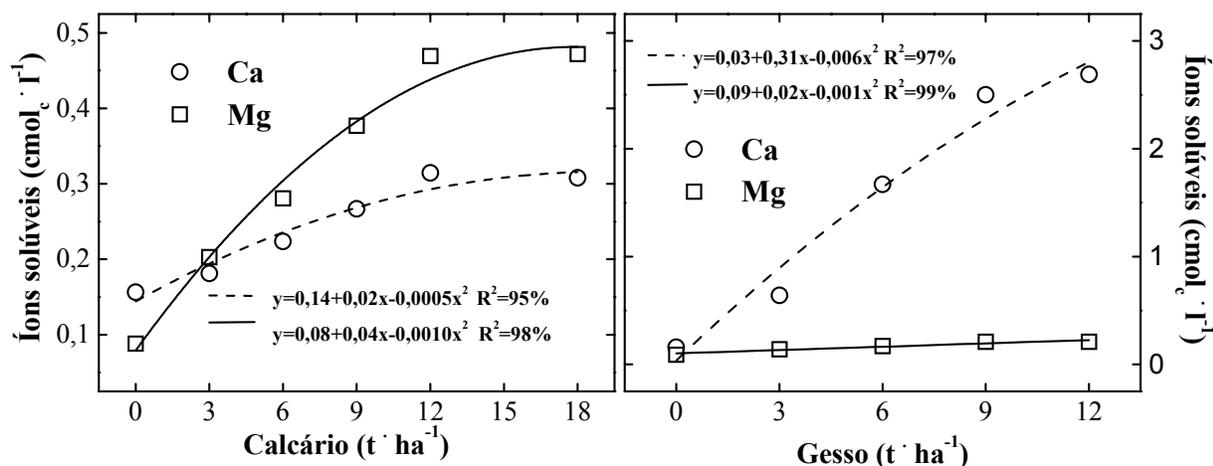


Figura 2. Teores de cálcio e magnésio solúveis num Cambissolo Húmico após a aplicação de doses de calcário dolomítico ou gesso agrícola.

Tabela 1. Valores de pH, condutividade elétrica, e K e Al trocáveis e solúveis de um Cambissolo Húmico, em função da aplicação de quantidades de calcário dolomítico ou de gesso agrícola. Média de três repetições.

Mg ha ⁻¹	pH	CE	Trocável		Solúvel	
			K	Al	K	Al
Calcário		S m ⁻¹	mg kg ⁻¹	cmol _c kg ⁻¹	Mg L ⁻¹	cmol _c L ⁻¹
0	3,93 f	0,041 b	75	5,40 a	5,7 a	0,126 a
3	4,36 e	0,044 b	71	3,14 b	4,6 ab	0,048 b
6	4,99 d	0,058 ab	70	1,18 c	4,3 ab	0,027 bc
9	5,53 c	0,062 ab	71	0,00 d	3,3 b	0,019 c
12	5,99 b	0,069 a	70	0,00 d	3,5 b	0,00 c
18	6,44 a	0,061 ab	71	0,00 d	3,7 b	0,00 c
F	***	**	ns	***	**	***
Gesso						
0	3,93	0,042 d	75	5,40	5,7 b	0,126 d
3	3,94	0,100 c	70	5,64	7,3 ab	0,238 c
6	3,97	0,175 b	71	5,49	7,8 a	0,363 b
9	3,96	0,234 a	71	5,73	8,7 a	0,512 a
12	3,96	0,243 a	71	5,69	9,2 a	0,522 a
F	ns	***	ns	ns	**	***

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). F indica o valor do teste F na análise de variância, sendo *, ** e *** para 5, 1 e 0,1 % de significância, respectivamente, e ns para não significativo.

Tabela 2. Coeficientes de seletividade entre cátions no solo em função da aplicação de quantidades de calcário ou de gesso agrícola.

Mg ha ⁻¹	R-Ca/K	R-Mg/K	R-Ca/Al	R-Mg/Al	R-K/Al	R-Ca/Mg
Calcário						
0	0,88	0,23	0,14	0,036	0,0028	1,89
3	1,52	1,28	0,33	0,281	0,0024	1,31
6	2,49	2,53	0,82	0,837	0,0030	1,42
9	2,51	2,85	nc	nc	0,0022	1,60
12	3,33	4,07	nc	nc	nc	1,79
18	4,22	5,40	nc	nc	nc	1,71
Gesso						
3	0,49	0,04	0,49	0,043	0,0003	6,82
6	0,57	0,02	1,35	0,046	0,0001	22,09
9	0,96	0,02	2,30	0,051	0,0001	39,06
12	1,26	0,02	3,13	0,053	0,0001	50,52

nc : não foi calculado devido a inexistência de Al.

O gesso agrícola aumentou o Ca solúvel em muito maior magnitude que o calcário (Figura 2). Essa forma de Ca aumentou de 0,16 cmol_c L⁻¹ (32 mg L⁻¹) no tratamento testemunha, para 2,50 cmol_c L⁻¹ (500 mg L⁻¹) onde se aplicou 9 Mg ha⁻¹ de gesso, e esse incremento equivale a 23% do Ca aplicado. Para a dose de 9 Mg ha⁻¹ de cada produto, o gesso aumentou a concentração do cálcio solúvel seis vezes mais do que o calcário dolomítico, mesmo possuindo um pouco menos de Ca em sua composição (16%) do que o calcário (19%). A maior habilidade do gesso em aumentar o Ca na solução do solo, relativamente ao calcário, se deve ao efeito desses produtos nas cargas elétricas do solo e na permanência de seus ânions na solução do solo (ERNANI et al., 2001b). A quase totalidade do Ca adicionado pelo calcário migra para as cargas elétricas negativas criadas tanto pela elevação do pH quanto pela desobstrução pela precipitação do Al. Além disso, os ânions do calcário não ficam na solução porque reagem com os ácidos do solo, impedindo que átomos de Ca permaneçam ali, uma vez que necessitam estar eletricamente neutros. O gesso agrícola, por ser um sal neutro, não altera o pH (ERNANI, 1986; ERNANI et al., 2001b) e as cargas elétricas e mantém o ânion sulfato quase que totalmente na solução do solo (ERNANI, 1986; DIAS et al., 1994), uma vez que é pouco adsorvido pela fase sólida.

O maior aumento provocado pelo gesso no Ca solúvel não significa que ele seja uma fonte mais eficiente de Ca que o calcário. A disponibilidade de Ca aos vegetais depende da atividade na solução do solo e de seu restabelecimento pela fase sólida à medida que as plantas o absorvem, assim como da relação quantitativa entre o Ca e os demais cátions na solução. Por isso, além das quantidades existentes em cada forma, a absorção de Ca é influenciada pelos demais cátions, principalmente K e Mg, e dos ânions que interferem na especiação iônica (PAVAN et al., 1982). O Ca oriundo do gesso, entretanto, tem maior mobilidade no solo do que o Ca adicionado via calcário (ERNANI, 1986; ERNANI et al., 2001b).

O gesso aumentou o Mg solúvel apesar de não possuir Mg (Figura 2). A adição de 9 Mg ha⁻¹ aumentou a concentração de Mg de 0,09 cmol_c L⁻¹ (11 mg L⁻¹) para 0,21 cmol_c L⁻¹ (25 mg L⁻¹), porque o Ca adicionado pelo gesso deslocou parte do Mg das cargas negativas para a solução do solo (ERNANI & BARBER, 1993). Esse aumento, entretanto, não afeta a disponibilidade geral de Mg para as plantas, porque não altera o poder tampão de Mg no solo, mas pode resultar em perdas desse nutriente no perfil por lixiviação (ERNANI, 1986).

Efeito nos demais cátions e atributos químicos do solo

Tanto o calcário quanto o gesso aumentaram a condutividade elétrica do solo (Tabela 1). Enquanto que nos tratamentos com calcário os valores não chegaram a duplicar, naqueles com gesso a condutividade elétrica aumentou em até seis vezes, devido a maior solubilidade desse produto em relação ao calcário.

O pH do solo aumentou com o aumento da dose de calcário, numa magnitude aproximada de uma unidade decimal por tonelada aplicada, porém não foi afetado pelo gesso (Tabela 1). A adição de gesso normalmente não altera o pH do solo, e isto tem sido extensivamente observado em vários tipos de solos (SUMNER et al., 1986; ERNANI, 1986; PAVAN et al., 1987; ERNANI et al., 2001b) uma vez que o gesso é um sal neutro. Em alguns solos com pH muito baixos, em consequência de reações secundárias provocadas pelo gesso no solo, pode haver uma pequena elevação (DAL BÓ et al., 1986; CAIRES et al., 1998) ou um pequeno decréscimo no pH (ERNANI et al., 2001b), e isso depende da relação entre a hidrólise do alumínio, que libera íons hidrogênio, e a adsorção específica do sulfato, que libera íons hidroxila.

O calcário e o gesso tiveram efeitos opostos no Al do solo (Tabela 1). A calagem diminuiu as duas formas (trocável e solúvel), em função da precipitação de Al na forma de $Al(OH)_3$. O Al trocável deixou de existir em valores de pH próximos a 5,5, enquanto que o Al solúvel desapareceu em valores um pouco maiores. A adição de gesso, por outro lado, não afetou o Al trocável, mas aumentou o Al solúvel, fenômeno também observado por PAVAN et al. (1982), em decorrência de seu deslocamento das cargas elétricas negativas pelo Ca adicionado pelo gesso (ERNANI & BARBER, 1993). Mesmo tendo aumentado o Al solúvel, o gesso tem diminuído a toxidez do Al aos vegetais (NOBLE et al., 1998) e, com isso, aumentado o crescimento de raízes em solos com alta concentração de Al (PAVAN et al., 1982; RITCHEY et al., 1980), em função da formação do par iônico $AlSO_4^+$ e da diminuição da atividade do Al.

O calcário e o gesso não alteraram o K trocável mas proporcionaram efeitos distintos no K solúvel (Tabela 1). O K solúvel diminuiu com a calagem devido ao aumento das cargas elétricas negativas provocadas pelo aumento do pH (ALBUQUERQUE et al., 2000), e aumentou com a gessagem devido ao seu deslocamento da fase sólida pelo Ca, uma vez que a atividade do Ca aumentou e as cargas elétricas não foram alteradas. Essas modificações normalmente não afetam a disponibilidade do K às plantas, porém a adição de grandes quantidades de gesso pode resultar em lixiviação de K, principalmente nos solos mais arenosos, com baixa capacidade de troca de cátions (ERNANI et al., 1993).

A preferência entre os cátions pelas cargas negativas variou com o produto aplicado. Nos tratamentos com calcário, os coeficientes de seletividade dos íons, que

demonstram a ordem de preferência pelas cargas negativas, foram $Al > Ca > Mg > K$ (Tabela 2), e mostram que a valência dos cátions teve maior influência na adsorção que o raio hidratado. Nos tratamentos com gesso, a preferência variou com a dose aplicada, e algumas relações entre cátions aconteceram de maneira oposta à verificada no solo calcariado: o Ca continuou tendo muito maior preferência que o Mg, mas teve maior preferência que o Al, nas maiores doses, e menor que o K, nas menores doses. Esse comportamento diferencial na preferência dos cátions pelos sítios de adsorção em função da adição de gesso ou calcário possivelmente está relacionado com a alteração do número de cargas negativas criadas pela elevação do pH.

CONCLUSÃO

1- O gesso foi mais eficiente que o calcário no aumento da concentração de Ca solúvel e, por isso, pode ser uma alternativa para aumentar a disponibilidade de Ca para culturas muito exigentes nesse nutriente, especialmente em solos nos quais a relação Ca:Mg esteja muito pequena ou necessitem de movimentação de Ca para o subsolo;

2- A preferência de alguns cátions pelas cargas negativas do solo variou com o produto aplicado (calcário ou gesso), mas o Ca sempre teve maior preferência que o Mg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, J.A.; BAYER, C.; ERNANI, P.R. & FONTANA, E.C. Propriedades físicas e eletroquímicas de um Latossolo Bruno afetadas pela calagem. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, 24:295-300, 2000.

ARGENTA, L. C. & SUZUKI, A. Relação entre teores minerais e frequência de bitter pit em maçã cv. Gala no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 1, p. 267-277, 1994.

CAIRES, E.F.; CHUEIRI, W.A.; MADRUGA E.F.; FIGUEIREDO, A. Alterações de características químicas do solo e resposta da soja ao calcário e gesso aplicados na superfície em sistema de cultivo sem preparo do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.22, p.27-34. 1998.

DIAS, L.E.; ALVAREZ, V.H.; COSTA, L.M.; NOVAIS, R.F. Dinâmica de algumas formas de enxofre em colunas de solos tratados com diferentes doses de fósforo e gesso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.373-380, 1994.

ERNANI, P. R. Alterações em algumas características químicas na camada arável do solo pela aplicação de gesso agrícola sobre a superfície de campos nativos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, Viçosa, v. 10, n.

3, p. 241-245, 1986.

ERNANI, P.R. & BARBER S.A. Composição da solução do solo e lixiviação de cátions afetadas pela aplicação de cloreto e sulfato de cálcio em um solo ácido. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.10, p.41-46, 1993.

ERNANI, P.R.; CASSOL, P.C.; MOGUTTI, H.; GARCIA, M.M.; VACARO, M. Aplicação de gesso agrícola e lixiviação de potássio em solos catarinenses. **Universidade & Desenvolvimento**, Florianópolis, v.1, p.7-16, 1993.

ERNANI, P.R.; DIAS, J.; AMARANTE, C.V.T. Application of calcium sprays had no effect on quality and storage life of 'Gala' apple fruits in Southern Brazil. In: International Symposium on foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants. p.114, Merano, Italy, 2001a.

ERNANI, P.R.; RIBEIRO, M.S.; BAYER, C. Modificações químicas em solos ácidos ocasionadas pelo método de aplicação de corretivos da acidez e de gesso agrícola. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.4, p.825-831, 2001b.

DAL BÓ, M. A.; RIBEIRO, A.C.; COSTA, L.M.; THIÉBAUT, J.T.L.; NOVAIS, R.F. Efeito da adição de diferentes fontes de cálcio em colunas de solo cultivadas com cana-de-açúcar. I. Movimento de bases no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, n. 3, p. 195-198, 1986.

HEWETT, E. W. & WATKINS, C.B. Bitter pit control by sprays and vacuum infiltration of calcium in "Cox's Orange Pippin" apples. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 3, p. 284-286, 1991.

NOBLE, A.D.; SUMNER, M.E.; ALVA, A.K. The pH dependency of aluminum phytotoxicity alleviation by calcium sulfate. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 52, n. 5, p. 1398-1402, 1988.

PAVAN, M.A. Alumínio em solos ácidos do Paraná: relação entre o alumínio não trocável, trocável e solúvel, com o pH, CTC, porcentagem de saturação de Al e matéria orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.7, n.1, p.39-46, 1983.

PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T.; PRATT, P.T. Toxicity of aluminum to coffee in ultisols and oxisols amended with CaCO_3 , MgCO_3 , and $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 46, p. 1201-1207, 1982.

PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T.; PEREIRA, F.J. Influence of calcium and magnesium salts on acid soil chemistry and calcium nutrition of apple. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 51, p. 1526-1530, 1987.

RITCHEY, K.D.; SOUZA, D.M.G.; LOBATO, E.; CORREA, O. Calcium leaching to increase rooting depth in Brazilian savannah oxisol. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, p.40-44, 1980.

SHEAR, C.B. Calcium-related disorders of fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, p. 361-365, 1975.

SUMNER, M. E.; SHAHANDEH, H.; BOUTON, J. Amelioration of an acid soil profile through deep liming and surface application of gypsum. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 50, p. 1254-1258, 1986.

WOLT, J. Soil solution: documentation, source and code program key. Version 1.4. Research report 89-19. The University of Tennessee, USA 27p.

RELAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO NA INFECÇÃO DE SEMENTES DE PIMENTÃO POR *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, CAUSADORA DO CANCRO BACTERIANO

RELATIONSHIP BETWEEN INOCULATION METHODS ON SWEET PEPPER'S SEEDS INFECTION BY *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CAUSED BY BACTERIAL CANKER

Amauri Bogo¹; Armando Takatsu²; Mari Inês C. Boff¹; Cassandro V. T. do Amarante¹.

RESUMO

Infecções em sementes de pimentão pelo agente causal do cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) foram induzidas por diferentes métodos de inoculação: a) pulverização das flores com uma suspensão bacteriana; b) inoculação por ferimento de agulha, através de uma gota de suspensão bacteriana, depositada sobre o pedúnculo de pequenos frutos; c) inoculação por ferimento de agulha, através de uma gota de suspensão bacteriana, depositada nas axilas do primeiro par de folhas permanentes e d) pelo métodos “a” e “b”. Todos os métodos de inoculação testados produziram sementes infectadas tanto no pericarpo, endocarpo e embrião, independentemente de apresentarem sintomas visuais. Infecções através desta rota podem ocorrer também no campo, quando a doença se torna epidêmica. A seleção de sementes pelo simples aspecto sanitário visual não é um método confiável, pois a bactéria pode ser transmitida por sementes sem sintomas visuais.

PALAVRAS-CHAVE: *Capsicum annuum* L., sanidade de sementes, transmissão por sementes.

SUMMARY

Seed infection of sweet pepper by bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) were induced by different methods of inoculation: a) spraying of flowers with bacterial suspension; b) prick inoculation of pedicel tip of small fruits with needle through a droplet of bacterial suspension; c) prick inoculation of stem through a droplet of bacterial suspension deposited at the insertions of first pair of permanent leaves and d) by methods “a” and “b”. All the inoculation methods produced infected seed with or without visual symptoms, with the infection in

pericarp, endosperm and embryo. When flowers were inoculated by spraying of flowers, the pathogenic bacteria seemed to invade seeds through calyx scar and vascular bundle. Infection through this route was suggested to occur in field when the disease become epidemic. The selection of seeds through visual sanity aspect is not trustful parameter because the bacteria can be transmitted by symptomless seeds.

KEY-WORDS: *Capsicum annuum* L., seeds sanity, seeds transmission.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis (CMM), agente causal do cancro bacteriano em pimentão (*Capsicum annuum* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pode sobreviver em sementes, no solo (BASU, 1970; STRIDER, 1969 e 1970; VOLCANI et al., 1970; DIAS & TAKATSU, 1989) e em hospedeiros secundários (ARK & THOMPSON, 1960). GROGAN & KENDRICK (1953) relataram que a transmissão da doença pelas sementes foi menor do que 1% em tomate e que a infecção pode ser controlada pelo tratamento químico de sementes. TSIANTOS (1987) mostrou que a transmissão de CMM por inoculações artificiais das sementes é muito variável. Os resultados dependem das condições ambientais durante a condução dos experimentos e dos métodos de inoculação. Além disso, o autor verificou que a alta umidade relativa favorece a disseminação do patógeno e que as plantas hospedeiras podem apresentar populações do patógeno em fase endofítica sem causar a doença. Portanto, estas populações podem se tornar patogênicas sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença.

A disseminação da bactéria a longas distâncias ocorre através de sementes contaminadas e caixas

¹ Eng. Agrônomo, Ph.D. - Universidade do Estado de Santa Catarina/UEDESC. Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV. Av. Luiz de Camões, 2090. CEP. 88520-000. Lages/SC. E-mail: a2ab@cav.udesc.br

² Eng. Agrônomo, Dr. - Universidade Federal de Uberlândia. Centro de Ciências Biológicas. Av. Amazonas s/n, Campus Umuarama. CEP. 38.405-320. Uberlândia/MG.

de colheita, enquanto que a curtas distâncias ocorre pela ação das chuvas, água de irrigação e principalmente, com a desbrota, a capina, o desbaste e outros tratamentos culturais (MOURA & OLIVEIRA, 1996; JONES et al., 1991). Conforme CHANG et al., (1991), a ocorrência de 0,01 a 0,05% de sementes de tomateiro infectadas é capaz de iniciar uma epidemia em uma lavoura de tomate.

Todos os trabalhos visando avaliar métodos de transmissão e localização de CMM em sementes foram feitos somente em tomate, e, como a doença vem se tornando problemática também na cultura do pimentão, este trabalho teve como objetivo estudar métodos de transmissão e localização do patógeno em sementes de pimentão.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de pimentão da cultivar Magda foram transplantadas para vasos com 10 litros de substrato [solo (50%), areia (15%), matéria orgânica (15%), vermiculita (15%) e adubo químico NPK 5-20-10 (0,5%)]. As plantas foram separadas em quatro parcelas e cada parcela constituída de seis plantas. Foram testados quatro métodos de inoculação do patógeno para as sementes, sendo a) plantas inoculadas por ferimento de agulha, através de uma gota de suspensão bacteriana com uma concentração de inóculo de 10^9 unidade formadora de colônia (UFC)/mL, depositada nas axilas do primeira par de folhas permanentes; b) pulverização das flores durante a polinização, com uma suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL; c) inoculação por ferimento de agulha, através de uma gota de suspensão bacteriana com concentração de 10^9 UFC/ mL, depositada sobre o pedúnculo de pequenos frutos e d) pelos métodos “b” e “c” subsequentes. As flores foram pulverizadas (pulverizador manual) com um volume de 500 mL de suspensão bacteriana a cada 2 dias, durante todo o período de florescimento. As plantas inoculadas pelo método “c” receberam apenas uma inoculação, quando os frutos apresentavam 15 a 20 mm de diâmetro. Ao

final do ciclo da cultura, os frutos maduros foram colhidos e as sementes extraídas para avaliação.

As sementes que apresentavam sintomas visuais de queima de bordos e encarquilhamento, bem como as sadias, receberam tratamentos diferenciados para avaliar a localização do patógeno no interior das sementes. Três métodos de detecção do patógeno nas sementes foram testados: a) lavagem durante 10 minutos com Tween 20 (0,02%) e plaqueamento em meio seletivo; b) desinfecção com álcool 70% durante 3 minutos, lavagem com água estéril, agitação durante 15 horas em tampão fosfato 0,05 M a temperatura de 4°C e plaqueamento em meio seletivo e c) trituração de sementes, que receberam o tratamento “b”, em cadinho de porcelana, e plaqueados em meio seletivo.

As sementes utilizadas nos tratamentos “b” e “c” foram lavadas previamente durante 10 minutos com Tween 20 (0,02%).

O meio seletivo utilizado para isolamento da bactéria das sementes foi o SCM (FATMI & SCHAAD, 1988). As placas foram incubadas por quatro a cinco dias a temperatura de 28°C, e, após este período, observou-se a presença ou não de colônias circulares de 1 a 2 mm de diâmetro, mucosas e de cor cinza escuro à preta, típica da bactéria CMM.

As variáveis apresentadas na Tabela 1 foram submetidas a análise de variância obedecendo ao delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para fins de análise, as quatro primeiras variáveis foram transformadas em $(x)^{1/2}$ e as demais em $\arcsen(x/100)^{1/2}$. As variáveis apresentada nas Tabela 2 e 3 foram submetidas a análise de variância obedecendo ao delineamento inteiramente casualizado, em parcelas sub-subdivididas, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados do presente estudo, pode-se observar que os métodos de inoculação testados induziram as plantas a produzirem uma diferença significativa no número total de frutos, no número total de sementes e na porcentagens de sementes com e sem sintomas visuais (Tabela 1).

Tabela 1- Comportamento na obtenção de sementes de plantas de pimentão cultivar Magda, inoculadas com uma suspensão bacteriana na concentração de inóculo de 10^9 UFC por mL de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em diferentes métodos de inoculação .

	MÉTODOS					
	testemunha	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	CV%
frutos analisados (n.)	7,54a	5,97 b	3,08 c	3,43 d	0,29 d	18,13
total sementes (n.)	954,18 a	147,16 d	208,22 c	163,56 c	600,89 b	7,81
sementes/frutos (n.)	451,42 a	0,1206 d	62,20 c	37,57 c	375,43 b	21,32
sementes sem sintomas visuais (n.)	954,18 a	123,85 c	123,39 c	85,83 c	580,47 b	11,42
sementes com sintomas visuais (n.)	-	30,81 c	91,14 b	90,75 b	15,94 d	10,45
sementes sem sintomas visuais (%)	100 a	91,40 b	62,58 c	60,37 c	97,48 a	1,68
sementes com sintomas visuais (%)	-	8,60 b	37,42 a	39,63 a	2,52 c	4,20

T₁: pulverização das flores; T₂: inoculação no pedúnculo fruto; T₃: pulverização flores mais inoculação no pedúnculo frutos e T₄: inoculação na axila do primeiro par de folhas permanentes. Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As plantas inoculadas na axila do primeiro par de folhas permanentes, produziram número maior de sementes por fruto e uma menor porcentagem de sementes com sintomas, quando comparado com os outros métodos (Tabela 1). Os métodos de pulverização das flores e pulverização das flores mais inoculações no pedúnculo dos frutos, produziram um número menor de sementes por fruto, quando comparado com os outros métodos (Tabela 1). Estes resultados provavelmente se devem ao fato de que os frutos provenientes dos tratamentos que receberam tanto pulverizações das flores separadamente e/ou combinado com inoculações no pedúnculo dos frutos, apresentaram sintomas de cancro muito forte, com encarquilhamento, rachadura, e, um menor tamanho dos frutos, quando comparados com os frutos provenientes das plantas inoculadas na axila do primeiro par de folhas permanente. Os métodos de pulverização das flores e pulverização das flores mais inoculação no pedúnculo dos frutos foram os que induziram maior porcentagem de sementes com sintomas (Tabela 1). As sementes com sintomas, proveniente dos diferentes métodos de inoculação, apresentaram uma coloração parda, com os bordos escuros e menor

tamanho que as sementes sadias, sugerindo que a bactéria invade a semente através da cicatriz do cálice e feixes vasculares do fruto.

Na Tabela 2, pode-se observar que sementes sintomáticas e assintomáticas foram infectadas, independentemente da região das sementes avaliada, sendo que a maior concentração de bactéria localizou-se primeiramente no pericarpo, em seguida no embrião e posteriormente no endocarpo. Inoculações por pulverização das flores mais inoculação no pedúnculo dos frutos produziram maiores infecções em sementes com e sem sintomas visuais, quando comparados com os outros métodos separadamente. Inoculações na fase inicial de desenvolvimento das plantas (primeira par de folhas permanentes) produziram baixa incidência de doença, sendo que a concentração da bactéria foi maior no pericarpo das sementes sem sintomas visuais, quando comparadas com as sementes sintomáticas (Tabela 3). Neste mesmo método de inoculação, não foi detectada a bactéria no endosperma em ambos os casos de sementes sintomáticas e assintomáticas (Tabela 2 e 3). Como a bactéria está presente tanto em sementes com e sem sintomas, é inviável a seleção de sementes para o

plântio de lavouras com base na sintomatologia. Isto sugere que as sementes contaminadas pela

bactéria são uma forma eficiente de sobrevivência e de disseminação do patógeno.

Tabela 2. Infecções no pericarpo, endocarpo e embrião de sementes com e sem sintomas, provenientes de plantas de pimentão do cultivar Magda, inoculadas com uma suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em diferentes métodos de inoculação.

INFECÇÃO DAS SEMENTES (n° colônias por placa)						
MÉTODOS	COM SINTOMAS			SEM SINTOMAS		
	pericarpo	endocarpo	embrião	pericarpo	endocarpo	embrião
T ₁	82,98 B a	4,33 C c	33,73 A b	76,46 A a	8,65 B b	7,78 A b
T ₂	60,83 C a	11,15 B c	20,49 B b	30,24 B a	7,04 B c	10,03 A b
T ₃	93,44 A a	24,17 A c	35,12 A b	80,85 A a	14,38 A b	5,28 B c
T ₄	7,56 D a	0,00 D c	5,51 C b	11,85 C a	0,00 C c	3,52 B b

T₁: pulverização das flores; T₂: inoculação no pedúnculo fruto; T₃: pulverização flores mais inoculação no pedúnculo frutos e T₄: inoculação no pecíolo do primeiro par de folhas permanentes. Coeficiente de variação dos tratamentos 8,84% e dos locais 8,20%.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 3. Infecções no pericarpo, endocarpo e embrião de sementes com e sem sintomas visuais, provenientes de plantas de pimentão do cultivar Magda, inoculadas com uma suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em diferentes métodos de inoculação.

INFECÇÃO DAS SEMENTES (n° colônias por placa)						
MÉTODOS	PERICARPO		ENDOCARPO		EMBRIÃO	
	sementes		sementes		sementes	
	com	sem	com	sem	com	sem
	sintomas	sintomas	sintomas	sintomas	sintomas	sintomas
T ₁	82,98 a	76,46 b	4,33 b	8,65 a	33,73 a	7,78 b
T ₂	60,83 a	30,24 b	11,15 a	7,04 b	20,48 a	10,03 b
T ₃	93,44 a	80,85 b	24,17 a	14,38 b	35,12 a	5,28 b
T ₄	7,56 b	11,85 a	0,00 a	0,00 a	5,51 a	3,52 b

T₁: pulverização das flores; T₂: inoculação no pedúnculo fruto; T₃: pulverização flores mais inoculação no pedúnculo frutos e T₄: inoculação no pecíolo do primeiro par de folhas permanentes. Coeficiente de variação dos sintomas: 8,22%.

Médias seguidas da mesma letra nas linhas, dentro da mesma região da semente, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Sendo a bactéria CMM um patógeno altamente contagioso, para seu controle recomenda-se uma série de medidas tais como: uso de produtos químicos à base de

antibióticos e fungicidas cúpricos, que visam impedir a introdução, multiplicação e disseminação do patógeno, mas que apresentam pouca eficiência, seja pela insensibilidade

do patógeno às drogas ou pela sua forma inadequada de aplicação (DHANANTARI, 1989); uso de cultivares resistentes; e evitar o plantio em locais anteriormente cultivados com pimentão e/ou tomate, obedecendo-se rotação de cultura por um período mínimo de 3 anos. Embora essas medidas permitam reduzir a porcentagem de sementes contaminadas e/ou infectadas por esse patógeno, não o erradicam.

A produção de sementes livres do patógeno é de grande importância para a indústria e para os agricultores e neste caso, indica-se como método mais eficiente e tradicional para o controle a utilização de sementes sadias, através da produção de sementes certificadas. O cancro bacteriano evidencia a importância de programas de certificação que envolvem tanto as inspeções visuais de campo, como testes de laboratório para a detecção da bactéria nas sementes. As inspeções, por sua vez, não asseguram a sanidade das sementes produzidas, pois sementes assintomáticas são uma fonte de inóculo em potencial, enfatizando a importância dos testes de laboratório, como instrumento complementar de controle. Neste sentido, várias técnicas podem ser sugeridas, como crescimento em meios diferenciais, inoculação em plantas hospedeiras, uso de bacteriófagos, imunofluorescência e meios seletivos e semi-seletivos.

Todavia, as técnicas tem sido elaboradas para detecção de bactérias em sementes, elas apresentam limitações quanto a sensibilidade, especificidade, custo e tempo de execução. A detecção de pequeno número de bactérias fitopatogênicas em sementes é dificultada pelo grande número de bactérias saprófitas taxonomicamente relacionadas ao patógeno que os acompanham e interferem com o crescimento do patógeno sobre meios seletivos.

CONCLUSÃO

1. Todos os métodos de inoculação testados produziram sementes infectadas, tanto no pericarpo, endocarpo e embrião, apresentando ou não sintomas visuais;
2. O método de pulverização das flores mais inoculação no pedúnculo dos frutos produziram maiores níveis de infecção em sementes com e sem sintomas visuais;
3. A seleção de sementes de pimentão livres de infecção ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pelo simples aspecto sanitário visual não é um método confiável, pois a bactéria pode ser transmitida por sementes sem sintoma visual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARK, P.A.; THOMPSON, J. P. Additional horsts for tomato canker organism *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 44, n.1, p. 98 – 99. 1960.

BASU, P. K. Temperature, an important factor determining survival of *Corynebacterium michiganense* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n.6, p. 825 – 827. 1970.

CHANG, R. J.; RIES, S. M.; PATAKY, J. K. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n.10, p. 1276-1281. 1991.

DHANANTARI, B. N. Effect of seed extration methods and seed treatments on the control of tomato bacterial canker. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, n. 4, p. 401-408. 1989.

DIAS, S. C.; TAKATSU, A. Fístula bacteriana do pimentão (*Capsicum annuum*) causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* no Brasil. **Summa Phytopatologica**, São Paulo, v. 15 n. 1, p. 10. 1989.

FATMI, M.; SCHAAD, N. W. Semi-selective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n.1, p. 121 - 26, 1988.

GROGAN, R. G.; KENDRICK, J. B. Seed transmission mode of overwintering and spread of bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense* (abstr.). **Phytopathology**, St. Paul, v. 43, n. 4, p. 473. 1953.

JONES, J.B.; JONES, J. P. STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases**. St. Paul. APS Press. 1991, 73 p.

MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R. Doenças causadas por bactérias em tomate e pimentão. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 1, p. 15-18. 1996.

STRIDER, D. L. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*: A literature review and bibliography. **North Carolina Agricultural**, v.193.110 p., 1969.

STRIDER, D. L. Tomato seedling inoculations with *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 54, n. 1, p.36 – 39. 1970.

TSIANTOS, J. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. **Phytopathology**, St. Paul, v.119, n. 2, p.142 - 146, 1987.

VOLCANI, Z.; ZUTRA, D.; COHN, R. A new leaf and fruit spot disease of pepper caused by *Corynebacterium*

michiganense. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 54, n.
9, p. 804 – 806. 1970.

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS COM A UTILIZAÇÃO DE MICROPIPETAS DE VIDRO OU PALHETAS ESTIRADAS

BOVINE OOCYTE VITRIFICATION WITH GLASS MICROPIPETES OR OPEN PULLED STRAW

Alceu Mezzalira¹; Arnaldo Diniz Vieira²; Fabiano Buss Cruz³;
Dilmar Paulo Barbieri⁴; Juliana Cardoso Damiani⁴

RESUMO

Com o objetivo de avaliar diferentes formas de envase no processo de vitrificação, complexos *cumulus oophorus* (CCOs) obtidos de folículos entre 2 e 8mm foram divididos aleatoriamente em três grupos e submetidos a maturação em TCM 199 sais de Earle com 10% de soro de égua em estro (SEE), em estufa a 39°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Com 22 horas de cultivo os grupos a serem vitrificados foram submetidos a pipetagens sucessivas para o desnudamento parcial, em uma placa contendo meio de manutenção (TCM-Hepes com 10% de soro fetal bovino - SFB), sendo então expostos a uma solução de equilíbrio composta por 400µl de meio de manutenção, adicionado de 50µl de EG e 50µl de DMSO, por 30 segundos. Em seguida foram transferidos para a solução de vitrificação composta por 300µl de uma solução de sacarose 0,8M em TCM-Hepes com 20% SFB, acrescido de 100µl de EG e 100µl de DMSO, envasados em grupos de cinco, em micropipetas de vidro (MV T1) ou palhetas estiradas (OPS T2) e vitrificados. O reaquecimento foi realizado pela imersão direta das MV e OPS numa solução de Sacarose 0,3M em meio de manutenção, a 37 –

38°C, onde os CCOs permaneceram por cinco minutos, quando foram transferidos para uma solução com 0,15M de sacarose por mais cinco minutos, antes de retornarem para o meio de manutenção. A seguir os ovócitos dos dois grupos retornaram ao meio de maturação por mais duas horas. A partir de então, todos os grupos foram submetidos aos mesmos procedimentos de fecundação e cultivo. Para a fecundação utilizou-se sêmen selecionado pelo processo de migração ascendente (swim-up), em meio TALP-SPERM, utilizando-se uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml. A incubação dos ovócitos com espermatozoides foi realizada por 18 – 22 horas, em 400µl do meio TALP-FERT, adicionado de 30µg/ml de heparina. O cultivo foi realizado em SOFaaci, sendo avaliadas as taxas de clivagem e blastocistos. Observou-se uma taxa de

clivagem de 55,5, 54,6 e 78,6% para os tratamentos MV, OPS e Controle, respectivamente. A taxa de blastocistos foi 10,0 e 7,9% para os tratamentos MV e OPS, respectivamente, que não diferiram entre si ($p>0,05$) e foram inferiores ($p<0,05$) aos 42,8% do tratamento controle. Os resultados deste estudo demonstram que as micropipetas de vidro estiradas podem ser utilizadas na vitrificação de ovócitos bovinos, proporcionando resultados semelhantes aqueles obtidos com as palhetas estiradas.

PALAVRAS-CHAVE: vitrificação, OPS, ovócitos bovinos, micropipetas.

SUMMARY

To evaluate the effect of different embryo containers in vitrification procedure, oocytes obtained from 2 to 8mm size follicles were randomly allocated in three groups and submitted to maturation in TCM 199 Earle salts medium with 10% of estrus mare serum (SEE), at 39°C, with 5% CO₂ atmosphere and 95% of relative humidity. After 22 hours of culture, two groups were submitted to a partial remove of cumulus cells by successive pipeting in a maintenance medium (TCM-Hepes + 10% fetal calf serum) and then exposed to an equilibrium solution with 50µl of EG and 50µl of DMSO in 400µl of maintenance medium, for 30 seconds. After that, they were transferred to a vitrification solution composed by 300µl of 0.8M sucrose solution in TCM-Hepes with 20% of fetal calf serum, added with 100µl of EG and 100µl of DMSO, and loaded in groups of five, in glass micropipetes (MV-T1) or pulled straws (OPS-T2) and vitrified. The warming was performed by direct immersion of MV or OPS in a 0.3M Sucrose solution in maintenance medium, at 37 - 38°C, during five minutes. The oocytes were then transferred to a 0.15M sucrose solution (five minutes) and then to a maintenance medium. Then, the oocytes of both groups returned to the maturation medium for an additional two hours culture period. All groups were then submitted to the

¹ Professor doutor, - Departamento de Clínica e Patologia. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV Av. Luís de Camões 2090 – 88520-000 Lages SC E-mail mezzalira@cav.udesc.br

² Professor, mestre – Departamento de Clínica e Patologia – UDESC / CAV Lages SC

³ Acadêmico – Medicina Veterinária – CAV/UDESC, Bolsista de Iniciação Científica do PROBIC/CNPq

⁴ Acadêmicos – Medicina Veterinária – Estagiários Laboratório de Reprodução Animal – UDESC / CAV

same fertilization and culture procedures. Fertilization was performed with 1×10^6 spermatozoa/ml, selected by swim-up procedure, and the incubation of oocytes / spermatozoa was performed in 400 μ l of TALP-FERT medium with 30 μ g/ml of heparin, during 18–22 hours. The culture was performed in SOFaaci. The cleavage rate of 55.5%, 54.6% and 78.6% was observed in the treatments MV, OPS and Control, respectively. The blastocyst rate was 10.0 and 7.9% for the MV and OPS treatments, respectively. There was not significant differences between treatments ($p>0.05$) and both were inferior ($p<0.05$) to the Control, 42.8%. These results demonstrated that the glass micropipetes could be used in the bovine oocyte vitrification, providing similar results than those obtained with the OPS.

KEY WORDS: vitrification, OPS, bovine oocytes, micropipetes.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de ovócitos bovinos proporciona a criação de bancos de recursos genéticos, permitindo o uso futuro em diversas biotecnologias, além de possibilitar um melhor planejamento da produção *in vitro* de embriões. No entanto, atualmente os resultados obtidos com ovócitos criopreservados são em geral muito baixos, com poucos atingindo os estágios de desenvolvimento adequados para transferência, não sendo assim comercialmente atrativos. Estes baixos índices são decorrentes da alta sensibilidade destas estruturas ao resfriamento, o que é determinado por características próprias como o tamanho, o inter-relacionamento com as células da corona radiata, a funcionalidade e o posicionamento de organelas, o alto teor lipídico e o coeficiente de permeabilidade de sua membrana. Estes fatores por sua vez, são diretamente influenciados pelo estágio de desenvolvimento e qualidade das estruturas. Assim, o grande tamanho, o elevado conteúdo lipídico e o complexo citoesqueleto, tem determinado uma baixa sobrevivência dos ovócitos ao protocolo normalmente utilizado na criopreservação de embriões, e que pressupõe uma curva de resfriamento de 0,3 a 0,6°C por minuto, até -30 ou -35°C, seguida da imersão em nitrogênio líquido.

Com a obtenção dos primeiros blastocistos provenientes de ovócitos criopreservados (LIM et al., 1991,1992), muitos dos pontos críticos da metodologia foram identificados. Estudos realizados por ARAV et al. (1993) confirmaram uma influência negativa, tempo dependente, da exposição de ovócitos a temperaturas inferiores a 20°C, demonstrando a necessidade de uma rápida passagem por essa faixa térmica, durante a criopreservação. O simples resfriamento, mesmo antes da congelação, provoca lesões na membrana plasmática e na estrutura citoesquelética dos ovócitos, determinando danos irreversíveis, que coincidem com a fase de transição

térmica dos lipídios de membrana (ARAV et al., 1996).

Na busca de metodologias que proporcionem sobrevivência aos ovócitos, grande número de investigações foram direcionadas para métodos alternativos de criopreservação, especialmente o congelamento ultrarrápido e a vitrificação, que possibilitam uma passagem rápida pela zona crítica de temperatura (PALLASZ & DEL CAMPO, 1995).

A vitrificação é um processo termodinâmico no qual o aumento da viscosidade determina que os fluidos crioprotetores adquiram propriedades mecânicas de um sólido amorfo semelhante ao vidro, porém mantendo as propriedades do líquido, prevenindo a formação de cristais de gelo. O sucesso da vitrificação está relacionado com a capacidade de permeação do crioprotetor, a concentração, o tempo de exposição e o volume, que devem ser adequados para impedir a formação de cristais de gelo intracelular, sem no entanto produzir lesões osmóticas ou tóxicas. Isto foi obtido pela primeira vez quando RALL & FAHY (1985) vitrificaram com êxito embriões de camundongos.

Muito embora estes métodos tenham proporcionado resultados satisfatórios com ovócitos de roedores, em bovinos os resultados são ainda pobres. MARTINO et al. (1996) obtiveram desenvolvimento até blastocistos de ovócitos bovinos congelados em grades de microscopia eletrônica (grids) mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido. Os autores consideram que a velocidade extremamente rápida de congelamento, obtida com a metodologia, permite a sobrevivência dos ovócitos e que esta velocidade não pode ser obtida quando se utiliza uma palheta normal no congelamento. VAJTA et al. (1997) demonstraram que a vitrificação em palhetas estiradas e abertas (Open Pulled Straws - OPS) permite a sobrevivência de embriões produzidos *in vitro*, possivelmente por aumentar a velocidade de congelamento e descongelamento, minimizando desta forma as injúrias durante a criopreservação. A metodologia foi adequada para a utilização com ovócitos, (VAJTA et al. 1998) permitindo a obtenção de resultados entre 7 e 13% de blastocistos. O diâmetro das palhetas utilizadas no método OPS (0,87mm) é bastante superior ao das micropipetas de vidro estiradas (0,35mm). Desta forma, as micropipetas devem proporcionar maior velocidade de congelamento, além de facilitar o manuseio dos ovócitos, realizado com elas próprias. Com a vitrificação de ovócitos bovinos em micropipetas de vidro, MEZZALIRA et al. (1999) obtiveram 100% de recuperação, 100% de sobrevivência pós descongelamento e 29,4% de clivagem após 24 horas de cultivo. Estes dados demonstram a viabilidade da

técnica e a necessidade de novas investigações que possibilitem sua adequação para a obtenção de índices satisfatórios de desenvolvimento embrionário, após descongelamento.

A adequação de um protocolo de criopreservação de ovócitos possibilitará um maior aproveitamento do material genético existente em nossos rebanhos, o que atualmente não vem acontecendo pela inexistência de uma metodologia definida que proporcione, resultados economicamente satisfatórios.

O presente estudo teve a finalidade de comparar a viabilidade de ovócitos bovinos maturados, vitrificados com a utilização de micropipetas de vidro ou palhetas estiradas.

MATERIAL E MÉTODOS

Ovários bovinos obtidos em frigoríficos e transportados ao laboratório em solução fisiológica 0.9% de NaCl a temperatura de 28 - 35°C tiveram os folículos de 2 a 8mm de diâmetro aspirados com um scalp 19G conectado a um tubo de ensaio mantido a 30°C, ligado a uma bomba de vácuo com pressão de 20 mmHg. A seleção das estruturas foi realizada em líquido folicular (LF), sob estereomicroscópio. Após a seleção, os CCOs foram aleatoriamente divididos em três grupos, constituindo os respectivos tratamentos. Os ovócitos foram então transferidos para 400µl de meio de maturação composto por TCM 199 sais de Earle (Cultilab), com 5,96mg/ml de Hapes (Sigma H 6147), 2,2mg/ml de NaHCO₃, 2,2µg/ml de piruvato de sódio, 0,01UI de rFSH/ml (Serono; L1930300), 0,5µg/ml LHb (USDA; AFP-11743-B)], com 10% de soro de égua em estro (SEE) (FIGUEIRÓ, et al. 2000), acondicionados em placas de quatro poços (Nunc A/S; Cat.176740), sendo incubados a 39,0°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Com 22 horas de cultivo os grupos a serem vitrificados foram transferidos para uma placa contendo meio de manutenção composto por TCM- 199 sais de Earle, adicionado de 6,5mg/ml de Hapes sais de sódio (Sigma H 7006), 0,42mg/ml de NaHCO₃ (Sigma S 4019) e 2,2µg/ml piruvato de sódio (Sigma; P 4562) + 10% de soro fetal bovino (SFB) e submetidos a um desnudamento parcial pela utilização de

pipetagens sucessivas, sendo então expostos a uma solução de equilíbrio composta por 400µl de meio de manutenção, adicionado de 50µl de EG (Sigma E 9129) e 50µl de DMSO (Sigma D 5879), por 30 segundos. Em seguida, foram transferidos para a solução de vitrificação composta por 300µl de uma solução de sacarose 0,8M em meio de manutenção com 20% de SFB, adicionado de 100µl de EG e 100µl de DMSO, permanecendo nesta solução por 20 a 25 segundos, período no qual foi realizado o envase.

Para a vitrificação, grupos de cinco ovócitos foram envasados em micropipetas de vidro (MV-T1) ou palhetas estiradas (OPS-T2) e mergulhadas em nitrogênio líquido. As micropipetas de vidro foram confeccionadas pelo aquecimento e estiramento de tubos de vidro (micro-hematócrito) até se obter um diâmetro interno próximo a 0,35mm, enquanto as OPS foram adquiridas (Szigta Ltd, Melbourne, Australia).

O reaquecimento foi realizado pela imersão direta das palhetas estiradas / micropipetas em 800µl de uma solução de reaquecimento (0,3M Sacarose em meio de manutenção) a 37°C, onde os CCOs permaneceram por cinco minutos, quando foram transferidos para solução com 0,15M de sacarose por mais cinco minutos, antes de retornarem para o meio de manutenção. Após o reaquecimento, os ovócitos dos dois grupos retornaram ao meio de maturação, sendo mantidos em estufa por mais duas horas para completar as 24 horas de maturação. Completada a maturação, os dois grupos tratados e o grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos de fecundação e cultivo.

Para a fecundação utilizou-se sêmen congelado, proveniente de um touro testado para FIV, sendo os espermatozoides selecionados pelo processo de migração ascendente (Swim-up), em meio TALP-SPERM, utilizando-se uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml. A fecundação foi realizada pela incubação dos ovócitos com espermatozoides por 18 – 22 horas, em 400µl do

meio TALP-FERT, adicionado de 30µg/ml de heparina (Sigma H 3393), em placas de quatro poços, nas mesmas condições de cultivo já descritas

Após a fecundação, os prováveis zigotos foram transferidos para uma placa NUNC com 800µl de TCM Hepes + 10% SEE, onde realizou-se a remoção das células do *Cumulus oophorus*, mediante fluxo leve produzido por pipetador de 1000µl. Em seguida, os prováveis zigotos foram submetidos a 3 banhos em meio de cultivo (SOF), acondicionados em placas de quatro poços com 400µl de SOFaaci (HOLM et al., 1999), sob óleo mineral (Sigma, M 8410), e incubados a 39°C em estufa de cultivo com atmosfera de 5% CO₂ até a avaliação da taxa de clivagem, realizada 48 horas após a inseminação. A partir de então utilizou-se uma bolsa impermeável à gases contendo uma atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, com umidade saturada, no período de cultivo restante. As bolsas foram mantidas em estufa de cultivo (Heraeus – Alemanha), para manter a temperatura. A segunda avaliação foi realizada em D8, sendo considerados viáveis os embriões que atingiram o estágio de blastocisto.

Foram realizadas 10 repetições, sendo os dados percentuais submetidos à análise de variância, utilizando-se o PROC GLM do SAS. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) entre os tratamentos que, todavia, foram inferiores ao controle não vitrificado (78,6%). A sobrevivência ao processo de vitrificação, evidenciada pelos percentuais de clivagem (Tabela 1) obtidos no tratamento MV-T1 55,5% e OPS-T2 54,6% são semelhantes aos 47 e 50% de clivagem obtidos por Vajta et al. (1998), aos 54,5% de sobrevivência obtidos por HURT et al. (1999) e aos 55,0% obtidos por MEZZALIRA et al (2002) com idêntica metodologia. HOCHI et al (2001) determinaram a velocidade de congelamento e reaquecimento para diversos diâmetros de micropipetas de vidro durante a vitrificação. Quando o diâmetro externo destas micropipetas tem 440µm, a velocidade de resfriamento durante a vitrificação chega a 12.000°C/min. e uma velocidade de reaquecimento de 62.000°C/min. O diâmetro das micropipetas utilizadas neste estudo é muito próximo aos das micropipetas utilizadas pelo autor, supondo-se que as velocidades de resfriamento e reaquecimento, são também semelhantes. Os resultados obtidos com a otimização dos diferentes tratamentos avaliados por HOCHI et al (2001) proporcionaram uma taxa de clivagem estimada em 54,5%, que é idêntica às obtidas neste estudo (55,5 e 54,6%) para os tratamentos MV e OPS, respectivamente. Ao final do processo de fecundação, os ovócitos com lesões severas sofridas na vitrificação eram facilmente identificados, sendo a manifestação mais comum a contração do citoplasma e a coloração palha amarelada, também descritos por MARTINO et al. (1996), além de casos esporádicos de fratura de zona pelúcida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 01 – Índices de desenvolvimento de embriões derivados de ovócitos vitrificados com a utilização de micropipetas de vidro (MV) ou com palhetas estiradas (OPS)

Tratamentos	Ovócitos n	Clivados		Embriões/clivados		Embriões/ Total %
		n	%	n	%	
MV	200	111	55,5	20	18,0 ^a	10,0 ^a
OPS	203	111	54,6	16	14,4 ^a	7,9 ^a
CONTROLE	336	264	78,6	144	54,5 ^b	42,8 ^b
TOTAL	739	486	65,7	180	-	-

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey 5%.

Na avaliação em D8, as taxas de blastocistos observadas no tratamento MV, 10,0% e no tratamento OPS, 7,9% não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$), muito embora sejam inferiores aos 13,0% (VAJTA et al., 1998). Entretanto, utilizando a mesma metodologia, porém com glicerol e etileno glicol como crioprotetores, LE GAL & MASSIP (1998) obtiveram 45,0% de clivagem no controle e apenas 7,9% no grupo vitrificado, resultados bastante inferiores aos obtidos no presente experimento, o que demonstra a necessidade de novas investigações que possibilitem melhorar os resultados e diminuir sua variabilidade. Quando o desenvolvimento embrionário foi avaliado considerando apenas os ovócitos que clivaram, as taxas de blastocistos em D8 foram de 18,0% para MV-T1 e 14,4% para OPS, que não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Estes índices são bastante inferiores aos 54,5% obtidos no grupo controle, nas mesmas condições. Isto demonstra que mesmo sobrevivendo ao processo de vitrificação e clivando, muitos zigotos perdem a capacidade de desenvolvimento até estágios mais tardios. Além dos danos determinados pelo próprio processo, é possível que uma série de fatores tenham influência nas taxas de desenvolvimento embrionário após a vitrificação de ovócitos. O desnudamento parcial, necessário à permeação dos crioprotetores em ovócitos maturados, é um fator que pode exercer grande influência. MEZZALIRA et al. (2002) observaram que o desnudamento parcial de ovócitos bovinos não resfriados, efetuado com 22 horas de maturação, determinou uma redução na taxa de blastocistos de 30 para 21%, demonstrando sua ação nociva. VAJTA et al. (1998) observaram um aumento na taxa de blastocistos de 13% para 25%, quando o desnudamento passou de 22 para 6 horas após o início da maturação, antes da vitrificação de ovócitos bovinos maturados. Fica claramente demonstrado que uma série de fatores podem influenciar nos índices obtidos após a vitrificação de ovócitos bovinos, sendo necessários novos estudos para sua avaliação.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as micropipetas de vidro estiradas podem ser utilizadas na vitrificação de ovócitos bovinos, proporcionando resultados semelhantes aqueles obtidos com as palhetas estiradas, possibilitando facilidade de manuseio e rapidez na execução do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAV, A.; SHERU, D.; MATTIOLI, M. Osmotic and

cytotoxic Study of Vitrification of Immature Bovine Oocytes. **J. of Repr. and Fert.**, v.99, p. 353-358, 1993.

ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S.B.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G.B.; CROWE, J.H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, n.6, p. 589-599, 1996.

FIGUEIRÓ, G.M., BRUM, D.S., MEZZALIRA, A., FIALHO, S.S., ALVES, M.R.L., RUBIN, M.I.B. E SILVA, C.A.M. Soro eqüino na PIV de embriões bovinos: análise do soro de égua em diferentes estágios do cio. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p.258, 2000 (Supl.).

HOCHI, S.; AKIYAMA, M.; MINAGAWA, G.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro matured bovine oocytes. **Cryobiology**, v.42, n.1, p.69-73, 2001

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa Medium supplemented with Sodium Citrate and Myo-Inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.

HURT, A.E.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.Jr. Vitrification of equine and bovine oocytes in na ethylene glycol, ficoll and sucrose using open pulled straws. **Theriogenology**, v.51. n.1, p.166, 1999. Abstract.

Le GAL, F.; MASSIP, A. Development of thawed oocytes fertilized *in vitro* after vitrification by the Open Pulled Straw method before or after *in vitro* maturation. In: **Gametes: Development and Function**, Lauria, A; Gandolfi, F. Editors, Milano,1998, p.554.

LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.35, n.6, p.1225-1235, 1991.

LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.37, n.2, p.351-361, 1992.

MARTINO, A.; POLLARD J.W.; LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.503-512, 1996.

MEZZALIRA, A; BARBIERI, D. P.; MULLER, F.; PINHO, C. C.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B.;

BERNARDI, M.L. Vitriificação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. **Arq.Fac.Vet. UFRGS**, v.27, n.1, p.262, 1999.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; BARBIERI, D.P.; MACHADO, M.F.; THALER NETO, A.; BERNARDI, M.L.; MONDINO, C.A.; RUBIN, M.I.B. Vitriificação de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro e expostos a citocalasina B. **Brazilian Veter. Journal**, (aceito p/public), 2002

PALASZ, T.A. & DEL CAMPO, M. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Recent advances. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES- BIOTECNOLOGIA E TECNOLOGIAS AVANZADAS,...**Anais**.. Montevideo, 4-5 maio 1995, p.78-85, 1995.

RALL, W. F., & FAHY, G. M. Ice-free criopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Letters to Nature**, v.313, p.573-575, 1985.

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo Letters**, v.18, p.191-195, 1997.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.176, 1998. Abstract.

CONGELAMENTO ULTRA – RÁPIDO DE EMBRIÕES BOVINOS

ULTRA-RAPID FREEZING OF BOVINE EMBRYOS

Alceu Mezzalira¹; Arnaldo Diniz Vieira²; Luiz Fernando Assis da Silva³; Valter Yoshiharu Kajiyama³

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o método ultra-rápido no congelamento de embriões bovinos produzidos *in vivo*, oito vacas *Bos taurus* foram submetidas a coleta de embriões, sete dias após o estro subsequente ao tratamento superovulatório. Foram utilizados embriões no estágio de mórula compacta e blastocisto jovem, com qualidade um ou dois, de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Após selecionados, vinte e sete embriões foram expostos a uma solução com 3,0M de glicerol e 0,25M de sacarose em meio de Dulbeccos (DPBSm) e envasados individualmente em palhetas de 0,25ml. Após 10 minutos, as palhetas foram acondicionadas sobre uma plataforma de isopor com 1,5cm de altura, mantida flutuando sobre o nitrogênio, com exposição ao vapor gelado por um minuto, antes de serem mergulhadas no líquido. Para o descongelamento, as palhetas foram expostas ao ar por cinco segundos, seguido da imersão em banho-maria a 35°C, por 20 segundos. A remoção do glicerol intracelular foi efetuada com um gradiente osmótico de 0,25M de sacarose em DPBSm durante 10 minutos, passando a seguir para o DPBSm onde completaram a rehidratação. Dos vinte e sete embriões congelados, vinte e seis foram transferidos, resultando em cinco receptoras prenhes (19,2%) e no nascimento de cinco animais normais e saudáveis. Conclui-se que o método de congelamento ultra-rápido permite a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo*, entretanto com índices de prenhez inferiores aos obtidos com o método de congelamento convencional, indicando a necessidade de novas investigações para adequação do método para a espécie bovina.

PALAVRAS-CHAVE: criopreservação, ultra-rápido, transferência de embrião, *in vivo*, prenhez

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the ultra-rapid freezing of bovine embryos *in vivo* produced. Eight *Bos taurus* cows were submitted to embryo collection on

day seven after multiple ovulation estrous induction. Only embryos at the late morulae and early blastocyst stage, and classified as grade one or two, according International Embryo Transfer Society (IETS), were used. After selected, twenty-seven embryos were exposed to a solution with 3.0M of glycerol and 0.25M of sucrose in Dulbecco's medium (DPBSm), and individually loaded in 0.25ml straw. After 10 minutes, the straw was placed on a 1.5cm height styrofoam platform maintained floating in the liquid nitrogen. The straw was maintained in the cold vapor during one minute and then plunged in the liquid nitrogen. The warming was performed by five seconds air exposure, followed by the submersion in a 35°C water-bath during 20 seconds. The intracellular cryoprotectant removal was performed by the use of an osmotic 0.25M sucrose gradient, during 10 minutes, followed by DPBSm to complete the rehydration. The embryos were then loaded in 0.25ml straws and in ovulated in synchronous recipients, by transcervical method. Twenty-six of twenty-seven frozen embryos were transferred, resulting in five pregnant (19.2%) recipients, and born of five healthy and normal calves. We conclude that the ultra-rapid freezing method permits the cryopreservation of *in vivo* bovine embryos, however the pregnancy rates are still lower than that obtained with the conventional freezing method, indicating the need of new investigations to adequate the method for bovine embryos.

KEY WORDS: cryopreservation, ultra-rapid, embryo transfer, *in vivo*, pregnancy

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol no congelamento de células (POLGE et al., 1949), muitos conhecimentos foram acumulados a respeito da criobiologia e principalmente da criopreservação de gametas e embriões. Na década de 70, WHITTINGHAM et al. (1972) relataram o nascimento do primeiro produto de embrião congelado, um camundongo. Já no ano seguinte, obteve-se o nascimento do primeiro bezerro oriundo de embrião congelado (WILMUT & ROWSON, 1973). Desde então, muitos dos mecanismos determinantes de danos

¹ Méd. Veterinário, Professor, Doutor em Reprodução Animal – Centro de Ciências Agroveterinárias. Autor para correspondência mezzalira@cav.udesc.br

² Méd. Veterinário, Professor, Mestre em Reprodução Animal – Centro de Ciências Agroveterinárias

³ Méd. Veterinários – autônomos

durante o congelamento, foram identificados e contornados.

Sendo a água o principal constituinte celular e a principal responsável pela manutenção dos sistemas vivos, as perturbações determinadas pelo congelamento vão ter um reflexo direto na sobrevivência destas células. A adequada desidratação celular é fundamental para evitar a formação de grandes cristais de gelo, que rompem as estruturas citoesqueléticas, bem como para prevenir a excessiva concentração de solutos intracelulares (MAZUR et al, 1972). Durante o processo de congelamento convencional, os embriões são expostos a soluções com concentração de 1,6 a 1,8M de glicerol, que mesmo antes do congelamento penetra na célula, substituindo parte da água intracelular, por efeito osmótico. Entretanto, ainda existe necessidade de aumentar a desidratação da célula, o que é obtido com o abaixamento controlado da temperatura da solução que contém o embrião, após a indução da cristalização. Inicialmente apenas a água extracelular é congelada, determinando o aumento do gradiente osmótico da solução, provocando a saída de água intracelular para o ambiente extracelular. A medida que a temperatura decresce, mais água é cristalizada e maior desidratação celular ocorre. Este processo é obtido mediante a utilização de aparelhos que permitam o controle da curva de resfriamento a uma velocidade de 0,3 a 0,5°C por minuto, até atingir uma temperatura de -30 a -35°C, no caso do congelamento rápido (convencional). Os índices de prenhez obtidos com essa metodologia são bastante satisfatórios, girando em torno de 50 a 60%. Entretanto, o custo de alguns equipamentos, bem como o próprio tempo consumido na realização da curva de resfriamento, tem limitado a expansão da criopreservação e da própria prática de transferência de embriões bovinos. Como forma de contornar estes fatores, métodos alternativos de congelamento tem sido propostos. A observação de que o uso de gradientes osmóticos podem acelerar a desidratação celular, ainda em temperatura ambiente, sugere a possibilidade de dispensar a curva controlada de resfriamento. TAKEDA et al. (1984) e TAKAHASHI & KANAGAWA (1985) desenvolveram uma metodologia que possibilita o congelamento direto de embriões murídeos, sem a necessidade do emprego de equipamentos sofisticados de congelação, o chamado método ultra-rápido. Com esta tecnologia, MEZZALIRA (1991) obteve entre 83,6 e 92,9% de blastocistos eclodidos após o congelamento de mórulas e blastocistos, e até 32% de fetos, após transferência cirúrgica para camundongas receptoras. Com embriões bovinos, os relatos de literatura são escassos, existindo a necessidade de estudos que avaliem esta tecnologia para a espécie. A crescente necessidade de facilitar o acesso a novas tecnologias, aliada ao grande poder de disseminação do material genético pela transferência de embriões, determinaram o interesse na adequação do método ultra-rápido para embriões bovinos, tanto por sua praticidade como por seu baixo custo de

execução. Estes fatos justificam a execução deste experimento, que tem por objetivo avaliar a taxa de prenhez após transferência de embriões bovinos congelados com o método ultra-rápido.

MATERIAL E MÉTODOS

No período entre 1993 e 1994, oito vacas *Bos taurus*, com aptidão leiteira, foram submetidas a estimulação de múltiplas ovulações mediante aplicação de duas doses diárias de FSH (SUPER-OV[®]), durante quatro dias. O tratamento superovulatório foi iniciado entre os dias 08 e 12 após o cio base, com aplicação de FSH realizadas a cada 12 horas. Juntamente com a 6ª aplicação do FSH, foi aplicado um análogo da prostaglandina F2 α (CIOSIN[®]) para lise do corpo lúteo, induzindo o cio em 24 a 48 horas (dia zero). As inseminações foram realizadas 12 e 24 horas após o final do cio, respectivamente. A coleta dos embriões foi realizada por via transcervical, no sétimo dia após o cio, com a utilização de sondas do tipo Foley nº18. Cada corno uterino foi lavado separadamente, com a utilização de 500ml do meio de Dulbeccos, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O meio de lavagem recuperado foi armazenado em frascos de vidro siliconizados, nos quais foi feito o transporte até o laboratório. Após dez minutos de decantação, o sobrenadante foi removido por sifonagem, sendo o sedimento transferido para placas de Petri quadriculadas. A busca e seleção das estruturas foi realizada sob estereomicroscópio com 40 aumentos. Após serem encontrados, as estruturas foram transferidas para uma nova placa, contendo meio limpo, onde procedeu-se a seleção e classificação dos embriões, de acordo com os padrões da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), sendo utilizados apenas mórulas compactas e blastocistos iniciais, classificados como excelentes (grau I) ou bons (grau II). A seguir, os embriões foram expostos a uma solução crioprotetora composta por glicerol 3,0M e sacarose 0,25M em DPBSm, com a qual foram individualmente envasados, em palhetas de 0,25ml. Ao final de 10 minutos, as palhetas

foram acondicionadas sobre uma plataforma de isopor, vazada, com 1,5cm de altura, que foi mantida flutuando sobre o nitrogênio líquido, numa caixa de isopor medindo 35x29x23cm, permanecendo expostas ao vapor gelado por um minuto, antes de serem mergulhadas no líquido.

O armazenamento foi realizado em botijão criogênico, por período não inferior a uma semana. O descongelamento foi realizado mediante a exposição da palheta ao ar por cinco segundos, seguido da imersão em banho-maria a 35°C por 20 segundos. A seguir, procedeu-se a remoção do glicerol intracelular pela ação de um gradiente osmótico de 0,25M de sacarose em DPBSm durante 10 minutos, passando a seguir para o DPBSm, onde completaram a rehidratação. Todos os embriões, independente de sua qualidade após o descongelamento, foram utilizados, sendo envasados individualmente em palhetas de 0,25ml, para inovulação por via transcervical em receptoras síncronas. As receptoras foram previamente submetidas a exame ginecológico completo e selecionadas pela qualidade do corpo lúteo e sistema genital, sendo submetidas a anestesia epidural baixa com lidocaina a 2%, sem vasoconstrictor. O diagnóstico de gestação foi realizado por palpção retal, 60 dias após a transferência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos vinte e sete embriões congelados, vinte e seis foram transferidos, sendo um perdido por rompimento da palheta no momento do descongelamento. Após o diagnóstico de gestação, cinco receptoras resultaram prenhes (19,2%), conforme está demonstrado na Tabela 01, parindo produtos normais e saudáveis.

Tabela 01. Resultados de prenhez obtidos após transferência de embriões bovinos congelados pelo método ultra-rápido

Coleta	Embriões Congelados	Embriões Transferidos	Prenhez
01	04	04	0
02	02	02	01

03	06	05	0
04	03	03	02
05	07	07	01
06	02	02	0
07	01	01	0
08	02	02	01
TOTAIS	27	26	05

Observou-se uma grande variabilidade de resultados nas diferentes coletas. Como exemplo, das doadoras de números 01 e 03, mesmo com o congelamento de um número expressivo de embriões (04 e 05, respectivamente), não se obteve gestação. O número relativamente pequeno de embriões congelados e a impossibilidade de manter um grupo controle com congelamento convencional, não permitem avaliar se a variação observada foi motivada pela metodologia proposta, ou por uma condição inerente às próprias doadoras.

Os dados encontrados na literatura internacional são escassos com embriões bovinos congelados com o método ultra-rápido, sendo constituídos apenas por avaliações *in vitro*. CHUPIN (1986), trabalhando com blastocistos iniciais produzidos *in vivo* e usando uma solução composta de 2,8M de glicerol e 0,25M de sacarose em DPBSm no congelamento, e 1,0 M de sacarose no descongelamento e remoção do glicerol, obteve 17,3% de eclosão, após congelamento ultra-rápido. Estes resultados, embora sendo de cultivo *in vitro*, são comparáveis aos 19,2% de prenhez obtidos neste experimento. No mesmo trabalho, CHUPIN (1986) obteve 56,4% de eclosão quando congelou blastocistos expandidos, com a mesma metodologia, demonstrando a influência do estágio de desenvolvimento, nas taxas de sobrevivência. Em trabalho subsequente, utilizando uma solução crioprotetora composta de 2,1M de glicerol e 0,25M de sacarose, CHUPIN (1987) observou uma grande variação na viabilidade de embriões submetidos a diferentes tempos de exposição e temperaturas da solução crioprotetora, obtendo 67,7%, 18,5% e 54,2% de eclosão após uma exposição por dois minutos e sete minutos à temperatura ambiente, ou sete

minutos à 37°C, respectivamente. MEZZALIRA (1991) e MEZZALIRA & RUBIN (1992), relatam resultados com até 92,9% de blastocistos eclodidos e 32% de fetos, após o congelamento de embriões de camundongos, demonstrando uma perfeita adequação para esta espécie. BERNARDI et al., (1991) obtiveram um bezerro nascido após transferência de embriões congelados com o método ultra-rápido, sendo este o primeiro relato de nascimento desta espécie com o método ultra-rápido. Assim, o presente estudo reveste-se de importância, demonstrando a possibilidade de obter o nascimento de animais vivos e perfeitos após o congelamento de embriões com o método ultra-rápido. Embora os resultados ainda não sejam comercialmente atrativos, demonstram que o método pode proporcionar uma eficiente crioproteção aos embriões, devendo-se buscar sua adequação aos diferentes estágios as diferentes características do embrião bovino.

Desta forma, é possível que novos estudos possibilitem um aumento da viabilidade embrionária, através da adequação da metodologia, permitindo a obtenção de índices de prenhez comercialmente atrativos e comparáveis aos obtidos com a metodologia de congelamento convencional, porém com a simplificação e redução de custos da técnica.

CONCLUSÃO

Embriões bovinos produzidos *in vivo* podem ser criopreservados com o emprego de uma solução crioprotetora composta por 3,0M de glicerol e 0,25M de sacarose, usando o método de congelamento ultra-rápido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B, COSTA, C.P.D., MEZZALIRA, A., SILVA, C. A.M. Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos: Primeiro terneiro obtido no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 6, 1991, Curitiba, **Anais...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1991. p.51.

CHUPIN, D. Quick freezing of bovine blastocysts.

Theriogenology, v.25, n.1, p.147, 1986. Abstract.

CHUPIN, D. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.219, 1987. Abstract.

Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Editores David A. Stringfellow e Sarah M. Seidel, 3ed., 1999. 180p.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; CHU, H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Exp. Cell Res.**, n.71, p.345-355, 1972.

MEZZALIRA, A. **Congelamento ultra-rápido de mórulas *Mus musculus*: Efeito do pré tratamento e de diferentes concentrações de glicerol e lactose.** 1991. 74p. Dissertação(Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MEZZALIRA, A. & RUBIN, M.I.B. Ultrarapid freezing and transfer of mouse morulae. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.257, 1992. Abstract.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

TAKAHASHI, Y. & KANAGAWA, H. Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapor: Effects of sugars. **Jpn. Vet. Res.**, n.33, p.141-144, 1985.

TAKEDA, T.; ELSDEN, P.; SEIKEL Jr, G. E. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. **Theriogenology**, n.21, v.1, p.266, 1984. Abstract.

WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. **Science**, n.178, p.411-414, 1972.

WILMUT, I. & ROWSON, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Vet. Rec.**, n.92, v.26, p.686-690, 1973

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE *BRUCELLA OVIS*

COMPARISON OF ANTIGENS USED FOR THE DIAGNOSIS OF *BRUCELLA OVIS*

Priscilla Karina Vitor Koerich¹; Adil Knackfuss Vaz²

The same antigen had higher protein concentration than the standard and the other antigens.

RESUMO

O diagnóstico sorológico por imunodifusão radial da brucelose ovina causada por *Brucella ovis* é uma importante arma contra esta enfermidade, podendo também ser utilizada para a brucelose canina por *Brucella canis*, uma vez que há reação cruzada entre as duas bactérias. Contudo, ao utilizar-se antígenos de diferentes origens no diagnóstico, podem ocorrer diferenças quanto à reação produzida, mesmo utilizando-se a mesma cepa bacteriana e técnica de produção semelhante. Foram analisados antígenos produzidos por dois laboratórios (antígeno I, Ila e I Ib) e um antígeno padrão, a fim de verificar se há diferenças entre padrões de bandas em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) destes produtos. A composição antigênica e a identificação de um antígeno padrão foram comparadas com antígenos comerciais pela técnica de PAGE e imunodifusão radial, onde foram encontradas 2 linhas de precipitação no antígeno Ila e uma linha de precipitação nos demais antígenos estudados. A concentração proteica dos diferentes antígenos foi obtida através do SENSIPROT.

PALAVRAS CHAVE: *Brucella ovis*, diagnóstico, comparação de antígenos

SUMMARY

Radial Immunodiffusion (RID) is the most widely used diagnostic method for sheep brucellosis due to *Brucella ovis*. It is also used for the diagnosis of canine brucellosis caused by *Brucella canis*. Antigens used for RID are not standardized and it is possible that reagents from different sources may produce discrepancies, even if the same bacterial strain is used to produce the antigens. Antigens produced by two laboratories (antigens I, Ila and I Ib) were compared to an antigen produced following the techniques recommended by FAO/WHO, and considered as standard for the purposes of this study. Antigens were compared by PAGE analysis and RID, and protein concentration determined by the SENSIPROT technique. It was found that one antigen produced two precipitation lines in RID. The same product showed a different pattern of bands in PAGE, with an extra band of protein at 200 KDa.

KEY WORDS: *Brucella ovis*, diagnosis, antigen composition.

INTRODUÇÃO

O gênero *Brucella* inclui patógenos intracelulares Gram negativos de animais e humanos. Dentre as espécies encontradas na natureza, *Brucella canis* e *Brucella ovis* são muito patogênicas para seus hospedeiros na sua forma natural. *B. canis* infecta cães e *B. ovis* infecta ovinos, produzindo epididimo-orquites e abortos, ocasionando uma diminuição nos índices reprodutivos (CORBEL & BRINLEY-MORGAN 1984).

Exceto pelo lipopolissacarídeo (LPS), a resposta imune contra antígenos de *Brucella ovis* têm sido pouco estudada, e consequentemente há poucas informações da relação entre a estrutura celular e a resposta imune para este patógeno (RIEZU-BOJ et al. 1990).

Como em outras infecções por brucelas, a *Brucella ovis* é rapidamente fagocitada e desenvolve estratégias adaptativas através das quais resiste à degradação intracelular pelos macrófagos. A patogenicidade intracelular provavelmente proporciona um mecanismo para a bactéria evadir o controle imunológico. Quando a bactéria migra para o trato reprodutivo, ela entra na fase proliferativa. Uma vez que isso ocorre, os antígenos citossólicos são processados pelos macrófagos circulantes (CHIN & PANG-TURNER, 1990).

As brucelas são capazes de sobreviver durante um longo período dentro dos monócitos, o que a faz aparecer em células fagocitárias modificadas, que expressam o antígeno de brucela na sua superfície. Estas células poderiam multiplicar-se, perpetuando o estado de resistência. A imunização contra a brucelose requer uma alteração efetiva dos fatores celulares e humorais (CARRILO, 1972).

Os antígenos para *Brucella ovis* atualmente produzidos apresentam variabilidade entre partidas. Isto gera dificuldades para a padronização do diagnóstico e inibe a produção comercial desses antígenos. Devido a isso, foi feita uma comparação entre a composição antigênica e identificação proteica dos antígenos I, Ila e I Ib, e antígeno

¹ Aluna de Medicina Veterinária do CAV/UEDESC, bolsista PIBIC/CNPq

² Professor de Imunologia Veterinária, CAV/UEDESC, Caixa Postal 281 88502 -970 Lages, SC. E-mail a2akv@cav.udesc.br

padrão, através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI 1970); assim como imunodifusão radial (COGGINS & PATTEN 1970) e determinação da concentração protéica (WESTGARD & GROTH, 1981; MC ELDERY et al., 1982; DILENA et al., 1983).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do antígeno padrão:

Foram utilizadas bactérias liofilizadas da cepa REO (GENETZKY 1970) de *Brucella ovis* cultivadas em ágar sangue, a uma temperatura de 37° C por 72 horas. Após esse período, o cultivo foi analisado quanto à sua pureza, e repicado em 20 placas de ágar sangue, nas condições já citadas anteriormente. As bactérias foram colhidas por lavagem com solução tampão de fosfato pH 7,2 (PBS).

Imediatamente após a coleta, foi feita a centrifugação dessa suspensão celular a 1000 g. durante 15 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 5 ml de PBS estéril. O processo de centrifugação foi repetido mais uma vez.

O sobrenadante foi eliminado e a massa celular foi ressuspensionada em 10 ml de PBS estéril. A suspensão resultante foi agitada e aquecida em banho-maria a 80° C, durante 2 horas, agitando-se em intervalos aproximados de 15 minutos. Após resfriamento, a suspensão celular foi centrifugada a 1000 g durante 10 minutos para eliminar as macropartículas e restos celulares. O líquido sobrenadante que constitui o antígeno foi recolhido e congelado durante uma noite à temperatura de -20°C, e o sedimento foi descartado. O antígeno foi descongelado e centrifugado a 1000 g. durante 10 minutos para eliminar os lipídios. O sedimento foi eliminado e o sobrenadante congelado novamente. O sobrenadante foi dialisado a uma temperatura de 4° C, durante 3 dias contra PBS, sendo a solução trocada diariamente.

Análise dos antígenos:

Os antígenos I, IIa e IIb foram obtidos junto aos laboratórios produtores. Foi feita a imunodifusão radial com ágar Noble (Difco, USA) a 1% em tampão borato (COGGINS & PATTEN, 1970) utilizando-se cada antígeno contra um soro hiperimune produzido em dois coelhos contra a amostra REO.

As análises de bandas protéicas foram realizadas em SDS-PAGE (8% de acrilamida), coradas por "Coomassie Blue" (LAEMMLI 1970), com todas as amostras de antígenos, a fim de determinar a composição antigênica e comparar as proteínas em cada antígeno.

A análise das bandas produzidas foi feita através do "software" ImageJ (National Institutes of Health, USA).

A concentração proteica de todas as amostras foi obtida através do SENSIPROT (WESTGARD & GROTH, 1981; MC ELDERY et al., 1982; DILENA et al., 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos antígenos através de imunodifusão radial, com os três antígenos: I, IIa e IIb, e do antígeno padrão, mostrou que o antígeno IIa produziu duas linhas de precipitação, mostrando possuir dois componentes antigênicos (Figura I). Isto pode gerar dificuldades na interpretação dos resultados para diagnóstico, pois não se sabe se os componentes que reagiram, são idênticos aos que reagem em ovinos infectados. Os demais antígenos produziram uma única linha de precipitação.

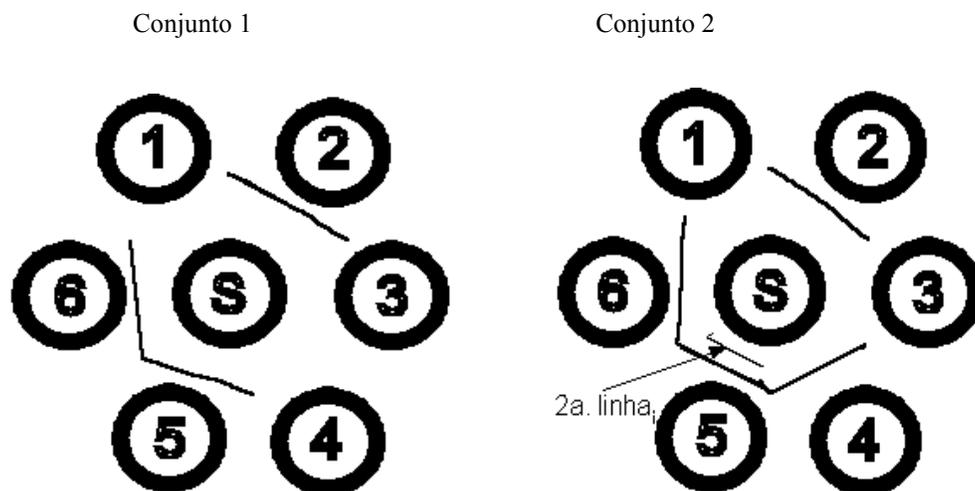


Figura 1. Imunodifusão radial usando soro hiperimune contra *B. ovis* e os antígenos em estudo

Conjunto 1 - (1), (3) e (4) vazios; (2) Antígeno padrão; (5) Antígeno IIb; (6) Antígeno I
Conjunto 2 - (1), (3) vazios; (2) Antígeno I; (4) Antígeno padrão; (5) Antígeno IIa; (6) Antígeno IIb
S - Soro hiperimune de coelho contra a amostra REO de *B. ovis*

Na análise do SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), foi observado que o antígeno padrão contém as mesmas bandas protéicas que o antígeno I e IIb. No entanto, o

antígeno IIa apresentou composição protéica diferente, conforme a Figura 2.

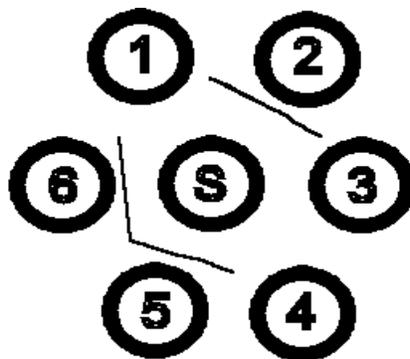


Figura 2. Bandas protéicas em SDS-PAGE utilizando os diferentes antígenos de *B. Ovis* (gel de acrilamida a 8% p/v, corado por Coomassie Blue)

- (a) Marcadores de peso molecular; (b) antígeno IIa; (c) coluna vazia; (d) antígeno IIb; (e) antígeno padrão; (f) antígeno I; (g) antígeno Iib

É possível verificar uma correlação de bandas entre os antígenos I, IIb e padrão. As bandas observadas ocorreram a aproximadamente 200KDa, 116.25KDa, 97.4KDa, 66.2KDa e 31KDa, respectivamente. O antígeno IIa apresentou uma banda concentrada em 200KDa. Segundo RIEZU-BOJ *et al.* (1989), através da técnica de SDS-PAGE e fazendo uma análise da composição antigênica de *B. ovis* corada pelo “Coomassie Blue”, foram observadas bandas protéicas a aproximadamente 67KDa, 28.5KDa, 22.5KDa e 19.5Kda. Estes resultados diferem

dos obtidos no presente trabalho, confirmando as diferenças entre os antígenos produzidos através da mesma técnica (Figura 3).

Através do SENSIPROT as concentrações proteicas determinadas foram: antígeno IIa 24,2 mg/dl; antígeno IIb 62,6 mg/dl; padrão 23,6 mg/dl; e antígeno I 37,5 mg/dl. O antígeno IIb apresenta uma concentração proteica superior aos demais antígenos, os quais possuem concentrações similares entre si. Não é possível,

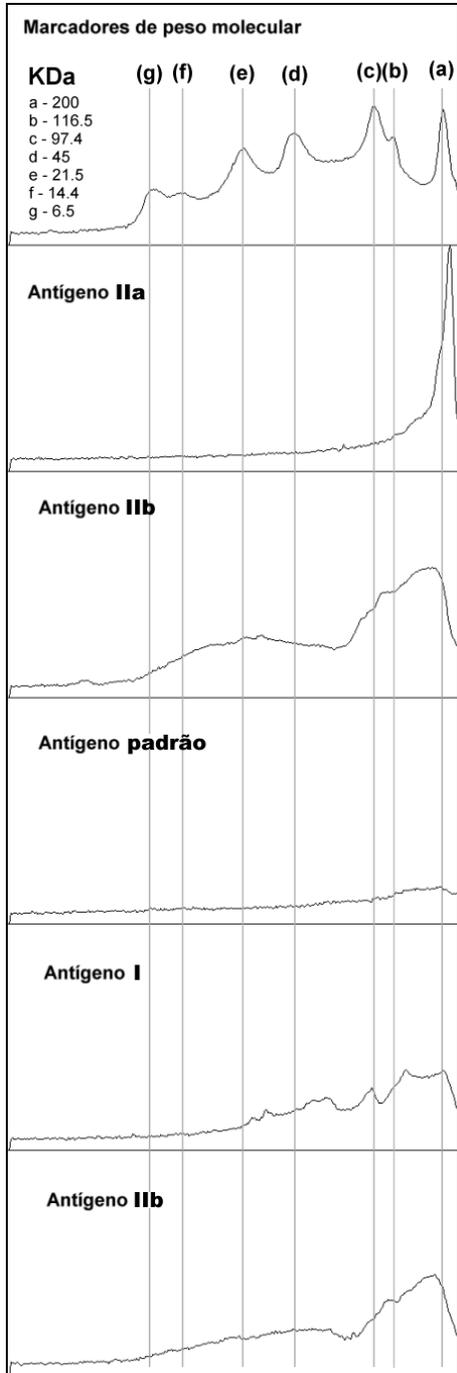


Figura 3. Análise do PAGE dos diferentes antígenos utilizados

portanto, atribuir a linha extra observada com o antígeno IIa a uma diferença quantitativa das proteínas presentes no mesmo. A linha extra pode ter sido causada por uma diferença no método de extração dos componentes de *Brucella ovis* que participam do antígeno, ou ainda à

presença de um contaminante, o qual poderia ser um contaminante bacteriano ou ser derivado de componentes do meio de cultivo.

CONCLUSÃO

Como todos esses antígenos são ou foram utilizados para o diagnóstico de *Brucella ovis*, é necessário verificar em soros hiperimunes de coelhos, e soros de carneiros infectados naturalmente, se os anticorpos produzidos reagem igualmente com as diferentes bandas proteicas identificadas. Caso isso não ocorra, podem haver resultados discrepantes se o diagnóstico sorológico de *Brucella ovis* for feito com antígenos diferentes, com a possível presença de bandas de precipitação extras dificultando a interpretação dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARRILLO, C.G. Conceptos sobre control de la Brucelosis; **Gaceta Veterinaria** p. 266, 1972
 CHIN, J. C., PANG-TURNER, B. **Journal of Clinical Microbiology**, Immunology Section v. 28 n. 1, p. 22647-2656, 1990.

COGGINS, L., PATTEN, V. Immunodiffusion test for Equine Infectious Anemia. Reprinted from PROCEEDINGS OF 74TH ANNUAL MEETING U.S. ANIMAL HEALTH ASSOC., p. 568-571, 1979.

CORBEL, M.J. & BRINLEY-MORGAN, W.J. Genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). In N. R. Krieg e J. G. Holt (ed.), **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, v. 1, p. 377-387. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.

DILENA B.A, PENBERTHY L.A, FRASER CG. Six methods for determining urinary protein compared. **CLINICAL CHEMISTRY** v. 29 n. 3, p. 553-7, 1983.

GENETZKY, R. M. Epididymitis in Rams. **COMPENDIUM ON CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTICING VETERINARIAN** v. 17 n. 3, p. 447-451, 1970

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4; **NATURE** n. 227, p. 680-685, 1970.

McELDERRY L.A, TARBITT I.F, CASSELLS - SMITH A.J. Six methods for urinary protein compared. **CLINICAL CHEMISTRY** V. 28 n. 2, p. 356-360, 1982.

RIEZU-BOJ, J. I.; MORIYÓN, I.; BLASCO, J. M.; GAMAZO, C. DIAZ, R. Antibody response to *Brucella*

ovis outer membrane proteins in ovine brucellosis. INFECTION AND IMMUNITY v. 58 n. 2, p. 489-494, 1990.

WESTGARD J.O, GROTH T. Design and evaluation of statistical control procedures: applications of a computer "quality control simulator" program. CLINICAL CHEMISTRY v. 27 n. 9, p. 1536-1545, 1981.