



ANTAGONISMO A FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE *Paspalum notatum* FLÜGGE POR *TRICHODERMA*

Anderson Rossi de Aguiar¹, Daniele Aguiar², Solange Bosio Tedesco³, Antonio Carlos Ferreira da Silva⁴

1. Pós-Graduando do PPG Agrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria (andiaqossi@yahoo.com.br)
2. Graduanda em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria
3. Professora Doutora do PPG Agrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria
4. Professor Doutor do PPG Agrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria
Av. Roraima, 1000 CEP 97105-900 Santa Maria, RS.

Recebido em: 30/09/2013 – Aprovado em: 08/11/2013 – Publicado em: 01/12/2013

RESUMO

Sementes de espécies vegetais do bioma pampa como *Paspalum notatum* geralmente possuem baixo poder germinativo, o que pode estar relacionado a micro-organismos patogênicos. Entre os principais micro-organismos antagonistas, está o gênero *Trichoderma*. O objetivo do presente trabalho foi analisar a incidência, identificar os gêneros de fungos presentes nas sementes da espécie *P. notatum*, e verificar o potencial antagônico de *Trichoderma* spp. Para a identificação dos fungos associados às sementes utilizou-se os métodos do papel de filtro e do plaqueamento em meio ágar sólido BDA (batata dextrose ágar). Com a técnica *in vitro* de confrontação direta foi observada a ação do antagonista sobre três fungos contaminantes de maior incidência, *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. e *Geniculosporium* sp. Utilizaram-se cinco isolados de trichoderma, TSM1, C1, 2B2, 2B12 e 2B22 e o produto comercial Trichodermil®, mais três tratamentos testemunhas, contendo somente os fungos isolados. Pelo método de plaqueamento em meio de cultura BDA é possível identificar microrganismos não detectados pelo método do papel de filtro. *Curvularia* sp. é o gênero de maior frequência nas sementes de *Paspalum notatum*. O isolado 2B2 mostra alta eficiência no confronto aos gêneros de fungos associados às sementes de *Paspalum notatum*.

PALAVRAS-CHAVE: Grama forquilha; *Trichoderma* spp.; Sanidade.

ANTAGONISM TO FUNGI ASSOCIATED WITH SEEDS OF *PASPALUM NOTATUM* FLÜGGE BY *TRICHODERMA*

ABSTRACT

Seeds of plant species such as *Paspalum notatum* from the Pampa biome generally have low germination rates that may be related to pathogenic microorganisms. Among the main antagonist microorganisms are some species of the genus *Trichoderma*. The objective of this study was to analyze the incidence, identify the fungal species present in the seeds of *P. notatum*, and check the

antagonistic potential of *Trichoderma* spp. The identification of fungi associated with seeds was analyzed using the methods of filter paper and plated on solid agar PDA (potato dextrose agar). With the in vitro technique of direct confrontation the action of the antagonist was observed on three fungal contaminants that presented higher incidence, *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Geniculosporium* sp. Five isolates of *Trichoderma* were used, TSM1, C1, 2B2, 2B12 and 2B22, the commercial product Trichodermil®, and three control treatments containing only the isolated fungi. In the method of filter paper the genera *Curvularia*, *Fusarium* and *Geniculosporium* were identified, while in the plating method the genus *Aspergillus* was observed in addition to these three. *Curvularia* sp. was the genre most frequently found in the seeds of *P. notatum*. The isolated 2B2 shows optimal performance in confrontation to the three identified fungi in the seeds of *P. notatum*.

KEYWORDS: Grass fork; *Trichoderma* spp.; Sanity.

INTRODUÇÃO

A qualidade sanitária das sementes pode ser analisada por meio de testes de sanidade, que possibilitam a identificação de problemas ocorridos durante as fases de produção de sementes, permitindo escolher métodos de controle para determinados fitopatógenos. As sementes de espécies provenientes do bioma pampa possuem baixo poder germinativo, e isto pode estar relacionado a microorganismos patogênicos. Microrganismos fitopatogênicos influenciam negativamente a qualidade fisiológica das sementes, a sua presença pode resultar em redução no potencial germinativo, e posteriormente no rendimento da espécie (PEDROSO, 2009). Além disso, as sementes infectadas podem disseminar agentes fitopatogênicos de uma região para outra, podendo contaminar áreas isentas de doenças (LAZAROTTO et al., 2012).

Neste contexto, os fungos destacam-se pela capacidade de sobrevivência em diversas condições ambientais em associação à sementes (KRUPPA E RUSSOMANNO, 2009). No entanto, entre os principais gêneros de microrganismos antagonistas, que possuem a habilidade de combater patógenos associados às sementes, está o gênero *Trichoderma*. Espécies de *Trichoderma* são eficientes contra uma série de fungos fitopatogênicos, atuando tanto pela produção de metabólitos voláteis como de não voláteis (CLAYDON et al., 1987). Há variação entre espécies e entre isolados da mesma espécie em relação à capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida.

Paspalum notatum Flügge (Poaceae), propaga-se por sementes. Por sua vez, o gênero *Paspalum* nas pastagens nativas do RS, é caracterizado como o gênero de maior importância sob o ponto de vista forrageiro (TOWNSEND, 2008). Portanto, testes de sanidade são essenciais para assegurar o sucesso do estabelecimento nos plantios, (MAEDA et al., 1997).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a incidência, identificar os gêneros de fungos presentes nas sementes da espécie *Paspalum notatum*, e verificar o potencial competitivo antagônico em relação a fungos fitopatogênicos de *Trichoderma* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

A identificação dos fungos associados às sementes foi realizada utilizando-se os métodos do papel de filtro e do plaqueamento em meio ágar sólido BDA (batata dextrose ágar). Estes dois tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento, cada parcela experimental constituída por 25 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. Antes da semeadura, as sementes passaram por um processo de desinfecção superficial em câmara de fluxo laminar, que consistiu da imersão das mesmas por 1 minuto em álcool 70%, 10 minutos em hipoclorito de sódio 1% e três lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada.

No método de papel de filtro utilizaram-se caixas tipo gerbox (11 x 11 cm) previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 10%, posteriormente em álcool 70% e três folhas de papel de filtro em cada, tratadas em autoclave (120°C/40 minutos), onde foram colocadas as sementes umedecidas com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel de filtro (BRASIL, 2009). As sementes foram incubadas em câmara BOD por 8 dias a 25°C em um regime alternado de luz (12 horas com luz e 12 horas sem luz).

No Método de plaqueamento em meio ágar sólido utilizou-se meio de cultura BDA (200g de batata, 20g de dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada). As sementes foram colocadas sobre a superfície do meio de cultura BDA vertido nas placas. Após a semeadura, as placas foram incubadas durante oito dias a 25°C, em um regime alternado de luz (12 horas com luz e 12 horas sem luz). Decorrido o período de incubação, em ambos os tratamentos, procedeu-se a observação dos microrganismos presentes com base em leituras individuais de cada parcela, bem como a confecção de lâminas e observação das estruturas fúngicas em microscópio óptico e a identificação baseando-se em características morfológicas e literatura pertinente para confirmação dos resultados (BARNETT E HUNTER, 2006). Os dados foram transformados em percentuais de incidência para cada microrganismo.

Técnica *in vitro* de confrontação direta

Com a técnica *in vitro* de confrontação direta foi observada a ação do antagonista sobre três fungos contaminantes de maior incidência, isolados previamente das sementes de *P. notatum*. Utilizaram-se cinco isolados de trichoderma, TSM1, C1, 2B2, 2B12 e 2B22, e o produto comercial Trichodermil® combinados com três fungos contaminantes: *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. e *Geniculosporium* sp., mais três tratamentos testemunha contendo somente os fungos contaminantes. Um disco de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), de 16 mm, contendo micélio e esporos dos fungos contaminantes foi transferido para placas de Petri (9 cm de diâmetro), que continham meio de cultura BDA, a 1 cm da borda. O material foi incubado durante 48 horas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Decorrido esse período, um disco de BDA de 16 mm de diâmetro, com estruturas dos antagonistas foi transferido para as placas em posição oposta ao disco de micélio do patógeno. As placas foram mantidas durante oito dias a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação foi realizada no oitavo dia após a introdução do antagonista, baseada no critério de Bell et al. (1982), que adota uma escala de notas variando de 1 a 5. Critérios de avaliação: 1- antagonista cresce por toda a placa de Petri; 2- antagonista cresce e atinge uma parte do patógeno, crescendo sobre 2/3 da placa;

3- antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa, nenhum organismo domina o outro; 4- patógeno cresce e atinge uma parte do antagonista, crescendo sobre 2/3 da placa; 5- o patógeno cresce por toda a placa. Também foi realizada uma avaliação aos 11 dias após a introdução do antagonista, a fim de se observar aqueles isolados que não apresentaram bom desempenho (notas entre 1 e 1,5) em oito dias.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 6 x 3 + 3, dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análise da frequência e identificação de micro-organismos associados às sementes de *Paspalum notatum*

Por meio dos métodos de papel de filtro e plaqueamento em meio de cultura BDA foi possível a detecção de gêneros fúngicos associados às sementes de *Paspalum notatum*, que estão apresentados na Tabela 1. Pelo método de papel de filtro foram detectados os gêneros *Curvularia*, *Fusarium* e *Geniculosporium*, enquanto que pelo método de plaqueamento em meio de cultura BDA, observaram-se além destes três, o gênero *Aspergillus*. O número de gêneros não foi maior dos que foram encontrados devido à desinfestação superficial realizada nas sementes antes da semeadura. Vanzolini et al. (2010) detectaram alta frequência de espécies fúngicas, entre elas o gênero *Fusarium*, encontradas também nas sementes de *Paspalum notatum*, e outros gêneros como *Macrophomina*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Helminthosporium*, *Epicoccum* e *Nigrospora*.

TABELA 1. Frequência de fungos (%) associados às sementes de *Paspalum notatum* detectados em papel de filtro e meio de cultura BDA.

FNI* = fungos não identificados

Gêneros de Fungos	(% Incidência)	
	BDA	PAPEL DE FILTRO
<i>Aspergillus</i>	1,75	0
<i>Geniculosporium</i>	2,00	0,75
<i>Curvularia</i>	36,00	9,25
<i>Fusarium</i>	1,25	2,00
FNI*	6,00	0,25
Total de sementes contaminadas	45	12,25

Os gêneros *Fusarium*, *Curvularia* e *Geniculosporium* foram observados em todos os tratamentos avaliados. Esses gêneros não são frequentemente associados às sementes de espécies forrageiras, possivelmente em função do número reduzido de trabalhos.

O gênero *Curvularia*, observado em 9,25% das sementes semeadas em papel de filtro e 36% em BDA, causa mancha nas folhas e nas glumas em gramíneas. Os sintomas são caracterizados por manchas marrom-avermelhadas ou escurecimento total. Em alguns casos as manchas restringem-se à parte superior ou inferior das glumas e apresentam centro mais claro (PRABHU et al., 1999).

Fusarium sp. foi encontrado em 2% das sementes no papel de filtro e 1,25% em BDA. Este gênero é disseminado por meio de propágulos e sobrevive no solo em restos culturais sendo suas estruturas de resistência denominadas clamidósporos. Estes esporos persistem por longos períodos em regiões de alta temperatura e baixa umidade (SARTORATO E RAVA, 1994).

A frequência do gênero *Geniculosporium* nas sementes de *P. notatum*, foi de 2% e 0,75% em BDA e papel de filtro, respectivamente. Espécies de *Geniculosporium* são comumente encontrados como endófitos de espécies arbóreas (PETRINI, 1985).

Por sua vez, o gênero *Aspergillus* não foi observado no papel de filtro, porém foi encontrado em 1,75% das sementes no BDA. Conforme Vechiato (2010), *Aspergillus* sp. faz parte do grupo dos fungos de armazenamento, que podem invadir a semente e causar podridão e deterioração das mesmas. Espécies desse gênero podem estar presentes como contaminantes ou sob a forma de micélio dormente, uma vez que sobrevivem nas sementes mesmo com baixos teores de umidade..

Micro-organismos não identificados foram detectados nos tratamentos em BDA. Conforme Neergaard (1979) é comum o aparecimento de micro-organismos variados como bactérias em testes de plaqueamento em ágar. É preciso considerar que há poucas informações sobre esses micro-organismos em relação à ocorrência de doenças em plantas.

Para a identificação de micro-organismos em sementes de espécies nativas do bioma Pampa, como do *P. notatum*, são necessárias informações sobre a associação patógeno-semente envolvendo estas espécies, as quais são escassas por serem pouco estudadas, sendo a primeira etapa para avaliar os danos que doenças podem causar às sementes e às mudas (BOTELHO et al., 2008), permitindo recomendar tratamentos específicos para micro-organismos causadores de danos na espécie estudada (LAZAROTTO, 2010).

Antagonismo *in vitro* de trichoderma a fungos presentes nas sementes de *P. notatum*

Aos oito dias do teste, o isolado 2B2 apresentou ótimo desempenho, obtendo a nota 1,0 no confronto aos três patógenos testados (Tabela 2). O isolado 2B22, mostrou eficiência no confronto a *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp., com nota 1,0 em ambos. Além dos isolados TSM1, C1 na confrontação com *Curvularia* sp. e o isolado 2B12 com *Fusarium* sp., com notas de 1,0 em todos os casos. Os isolados TSM1, C1, 2B22 e 2B12 na confrontação direta a *Geniculosporium* sp., com exceção do 2B2, obtiveram notas de 2,0, 2,0, 2,0 e 2,0 respectivamente. O produto comercial Trichodermil® aos oito dias, não obteve bom desempenho no confronto aos três patógenos testados, atingindo a nota 2,0 para cada fungo contaminante. Na segunda avaliação, realizada após 11 dias da incorporação do antagonista, os isolados 2B22, 2B12, TSM1, C1 e o produto comercial Trichodermil® aos 11 dias, não demonstraram melhora no desempenho, com relação ao confronto aos três patógenos testados.

TABELA 2. Média das notas de antagonismo de isolados de trichoderma a três fungos de maior frequência associados às sementes de *Paspalum notatum*.

Média das notas						
Tratamentos	<i>Curvularia sp.</i>		<i>Fusarium sp.</i>		<i>Geniculosporium sp.</i>	
	8 dias	11 dias	8 dias	11 dias	8 dias	11 dias
TSM1	1	1	2	2	2	2
2B2	1	1	1	1	1	1
2B12	2	2	1	1	2	2
2B22	1	1	1	1	2	2
C1	1	1	2	2	2	2
Trichodermil®	2	2	2	2	2	2
Testemunha	4	4	3	3	5	5

Os isolados de *Trichoderma* spp. além da antibiose, demonstraram que possuem outras habilidades como agentes de biocontrole. Conforme Bettiol (1991), uma característica importante é que o antagonista atue por meio de mais de um mecanismo, combinando antibiose, parasitismo, competição e estímulo à defesa do hospedeiro. No presente estudo, possivelmente ocorreu antibiose, hiperparasitismo e competição. Segundo Santos (2008), espécies de trichoderma possuem a habilidade como agente antagonista, inibindo a ação de fitopatógenos, que podem interferir no desenvolvimento normal da planta. Louzada et al. (2009) acrescentam que este fungo no controle de fitopatógenos, desenvolve ação direta e apresenta melhor exploração do solo pelo sistema radicular.

O potencial hiperparasítico de *Trichoderma* spp. está relacionado com a competição e com atividades metabólicas (HARMAN, 2000). Contudo, os mecanismos de ação podem estar relacionados às características específicas de cada isolado, o que possivelmente explica as diferenças observadas no desempenho.

CONCLUSÕES

Pelo método de plaqueamento em meio de cultura BDA é possível identificar microrganismos não detectados pelo método do papel de filtro.

Curvularia sp. é o gênero de maior frequência nas sementes de *Paspalum notatum*.

O isolado 2B2 mostra alta eficiência no confronto aos gêneros de fungos associados às sementes de *Paspalum notatum*.

REFERÊNCIAS

- BARNETT, H.L. AND HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4^a ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 2006. 218 p.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, p. 379-382, 1982.
- BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. (Boletim Técnico, n.5). Brasília: Embrapa, 1991. 5 p.
- BOTELHO, L. DA S.; MORAES, M. E. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, v.34, p. 343-348, 2008.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 395 p.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R. Antifungal alkyl pyrones produced by *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, p. 503 - 513, 1987.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p. 376–393, 2000.
- LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; MACIEL, C. G.; LONGHI, S. J. Sanidade, Transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrella fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 22, p. 493 – 503, 2012.
- LAZAROTTO, M. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cedro e patogenicidade de *Rhizoctonia* spp.** 2010. 90 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. **Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. Originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*** .*Biota Neotrop.* Jul/Sep 2009 v. 9, no. 3 Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v9n3/pt/abstract?article+bn02509032009>> Acesso em 25 de agosto de 2013. ISSN 1676-0603.
- KRUPPA, P. C. E RUSSOMANNO, O. M. R. Fungos em plantas medicinais, aromáticas e condimentares – solo e semente. **Comunicado Técnico Nº 93**, São Paulo: Instituto Biológico - Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2009.
- MAEDA, J.A.; PEREIRA, M. DE F.D.A. Caracterização, beneficiamento e germinação de sementes de *Paspalum notatum* Flugge. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, p.100-105, 1997.

NEERGARD, P. **Seed Pathology**. London: The Macmillan, 1979. 289p.

PEDROSO, D. C. **Associação de *Alternaria* spp. com sementes de apiáceas: métodos de inoculação e influência na qualidade fisiológica**. 2009. 118 f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PETRINI, L.; PETRINI, O. Xylariaceous fungi as endophytes. **Sydowia**. v. 38, p. 216-234, 1985.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M.C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e seu controle. In: Vieira, N.R. de A.A.; Santos, A.B. dos & Sant'ana, E.P. (Ed.) **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p.262-307.

SANTOS, F. E. M. DOS.; SOBROSA, R. C.; COSTA, I. F. D.; CORDER, M. P. M. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Revista Ciência Florestal**, v. 11, p. 13 – 20, 2001.

SANTOS, H. A. **Trichoderma spp. como promotores de crescimento em plantas e como Antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em ciências agrárias) – Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SARTORATO, A. E RAVA, C. A. **Principais Doenças do Feijoeiro Comum e seu Controle**. Brasília: Embrapa – SPI, 1994. 300 p.

TOWNSEND, C. R. **Características produtivas de gramíneas nativas do gênero *Paspalum*, em resposta à disponibilidade de nitrogênio**. 2008. 267 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

VANZOLINI, S.; MEORIN, E. B. K.; SILVA, R. A.; NAKAGAWA, J. Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 32, p. 09 – 14, 2010.

VECHIATO, M. H. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. **Comunicado Técnico Nº 136**, São Paulo: Instituto Biológico - Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2010.