

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS ITAQUI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Trichoderma* spp. NO
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS VEICULADOS PELAS SEMENTES E NA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ IRRIGADO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Lucas Bonorino Martini

**Itaqui, RS, Brasil
2011**

Lucas Bonorino Martini

**INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Trichoderma* spp. NO
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS VEICULADOS PELAS SEMENTES E NA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ IRRIGADO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Agronomia da Universidade Federal do
Pampa (UNIPAMPA), como requisito
parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia Agrônoma.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Zago Ethur

Itaqui, RS, Brasil
2011

Martini, Lucas Bonorino.

Influência de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de arroz irrigado/Lucas Bonorino Martini. Itaqui, 28 de novembro de 2011.

33 folhas: tamanho (30 cm)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia)
Universidade Federal do Pampa, Itaqui, 28 de novembro de 2011. Orientação: Dr^a. Luciana Zago Ethur.

1. *Oryza sativa* L. 2. micobiota de sementes. 3. antibiose. I. Ethur, Luciana Zago. II. Influência de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de arroz irrigado

Lucas Bonorino Martini

**INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Trichoderma* spp. NO
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS VEICULADOS PELAS SEMENTES E NA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ IRRIGADO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Agronomia da Universidade Federal do
Pampa (UNIPAMPA), como requisito
parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia Agrônoma.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido em: 28 de novembro de 2011.
Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Luciana Zago Ethur
Orientadora
Curso de Agronomia - UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho
Curso de Agronomia - UNIPAMPA

Prof^a. M.Sc. Paula Fernanda Pinto da Costa
Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UNIPAMPA

Dedico especialmente este trabalho a minha Mãe, ao meu Pai e Irmãos, pois foram e são grandes inspiradores e motivadores do meu dia a dia, e por tudo que eles me apoiaram ao longo destes anos. A família e aos amigos que nos melhores e principalmente nos piores momentos estiveram ao meu lado dando a força necessária.

AGRADECIMENTO

A Professora Luciana Z. Ethur pela orientação e por todo o seu apoio para que eu desenvolvesse e realizasse o meu trabalho de conclusão de curso, além de outras atividades ao longo da graduação.

Demais professores que se fazem presentes no corpo docente deste Campus, e aos que fizeram parte ao longo destes cinco anos e cinco meses, fica a minha gratidão pelos ensinamentos.

Aos colegas fica um agradecimento em especial, por todos os momentos vividos juntos dentro e fora das aulas e que essa amizade feita aqui dentro continue para sempre.

Para os funcionários pelos serviços prestados a toda comunidade acadêmica.

A todos aqueles que não foram lembrados, mas direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

“O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Trichoderma* spp. NO DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS VEICULADOS PELAS SEMENTES E NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ IRRIGADO

Autor: Lucas Bonorino Martini

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Zago Ethur

Local e data: Itaqui, 28 de novembro de 2011.

O cultivo do arroz requer alguns cuidados fitossanitários, como o uso de fungicidas no tratamento de sementes, porém, o tema ainda gera muitas dúvidas, no que se refere as estratégias para justificativa econômica do seu uso. As sementes de arroz são degradadas por ampla diversidade de patógenos que interferem no vigor e na germinação das mesmas. O fungo *Trichoderma* spp. tem sido utilizado no tratamento de sementes de várias culturas comerciais com fins sanitários e de desenvolvimento de plantas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a interferência de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de arroz irrigado. Para isso foram utilizados dois isolados (T11 e TM1) de *Trichoderma* spp. e realizados os testes e experimentos: isolamento de fungos das sementes de arroz irrigado; interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pela semente de arroz; teste de assepsia utilizando diferentes tempos de imersão das sementes em hipoclorito de sódio e de germinação das sementes de arroz irrigado e a interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. na germinação de semente de arroz. Como resultados foram encontrados os fungos *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Bipolaris oryzae* nas sementes de arroz e ocorreu interferência dos metabólitos não voláteis dos dois isolados de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento micelial dos fungos *Fusarium* e *Bipolaris oryzae*. O teste de assepsia mostrou que o tempo ideal de imersão no hipoclorito de sódio foi de 15 min e que os metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* spp. não interferiram na germinação das sementes. Portanto, os metabólitos secundários liberados pelos isolados de *Trichoderma* spp. testados

interferem no desenvolvimento dos fungos *Fusarium* e *Bipolaris oryzae* veiculados pelas sementes de arroz e não interferem na germinação da mesmas.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., microbiota de sementes, antibiose.

ABSTRACT

INFLUENCE OF SECONDARY METABOLITES OF *Trichoderma* spp. IN THE DEVELOPMENT OF FUNGI ASSOCIATED THE SEEDS AND GERMINATION OF SEEDS OF IRRIGATED RICE

Author: Lucas Bonorino Martini

Advisor: Dr^a. Luciana Zago Ethur

Place and date: Itaquí, November 28, 2011.

The cultivation of rice plant requires some care, as the use of fungicide seed treatment, but the subject still raises many questions, regarding the strategies for economic justification of its use. Rice seeds are degraded by a wide variety of pathogens that interfere with vigor and germination. *Trichoderma* spp. has been used to treat seeds of various crops for medical purposes and development of plants. The objective of research was to assess the interference of secondary metabolites of *Trichoderma* spp. the development of fungi transmitted by seeds and germination of rice. For this we used two strains (T11 and TM1) of *Trichoderma* spp. and conducted tests and experiments, isolation of fungi from the seeds of rice; interference from non-volatile metabolites of *Trichoderma* spp. the development of fungi transmitted by rice seed; testing aseptic immersion times using different seeds in sodium hypochlorite and germination of rice and interference from non-volatile metabolites of *Trichoderma* spp. germination of rice seed. As results were found fungi *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Bipolaris oryzae* in rice seed and there was no interference of volatile metabolites from two isolates of *Trichoderma* spp. the mycelial growth of *Fusarium* and *Bipolaris oryzae*. The test showed that the aseptic ideal time of immersion in sodium hypochlorite was 15 min and the secondary metabolites of *Trichoderma* spp. did not interfere in seed germination. Therefore, secondary metabolites released by *Trichoderma* spp. tested affect the development of fungi transmitted by rice seeds (*Fusarium* and *Bipolaris oryzae*) and do not affect the germination of rice seeds.

Keywords: *Oryza sativa* L., mycobiota seeds, antibiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema mostrando as etapas do teste do celofane	19
Figura 2: Esquema demonstrando o método de assepsia usado para a desinfestação das sementes de arroz.	21
Figura 3: Disposição das sementes de arroz sobre os metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp.	22
Figura 4: Fungos isolados das sementes de arroz. 1 - <i>Fusarium</i> spp.; 2 - <i>Penicillium</i> spp.; 3 - <i>Bipolaris oryzae</i>	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenvolvimento micelial (cm ²) de fungos retirados de sementes de arroz irrigado, crescendo sobre metabólitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	25
Tabela 2: Germinação e contaminação (%) de sementes de arroz imersas em hipoclorito de sódio a 2% por cinco tempos e colocadas em meio de cultura BDA.	26
Tabela 3: Germinação de sementes de arroz irrigado sobre metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	15
2.1.1 Tratamento de sementes com <i>Trichoderma</i> spp.....	15
2.1.2 Metabólitos de <i>Trichoderma</i> spp.....	16
2.2 Importâncias do arroz.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	18
3.2 Fungos da espermosfera de sementes de arroz irrigado.....	18
3.3 Interferência de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pela semente de arroz.....	18
3.4 Teste de germinação de sementes de arroz.....	20
3.5 Teste de assepsia das sementes de arroz.....	20
3.6 Interferência de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. na germinação de semente de arroz.....	22
3.7 Análise estatística	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Fungos da espermosfera de sementes de arroz irrigado.....	24
4.2 Interferência de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pela semente de arroz.....	24
4.3 Teste de germinação de sementes de arroz.....	25
4.4 Teste de assepsia das sementes de arroz.....	25

4.5 Interferência de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. na germinação de semente de arroz.....	27
5 CONCLUSÃO	28
6 REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*, L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo. É o segundo cereal mais cultivado no mundo, ocupando área aproximada de 158 milhões de hectares. A produção de cerca de 662 milhões de toneladas de grãos e em casca corresponde a 29 % do total de grãos usados na alimentação humana (SOSBAI, 2010).

A sanidade é um dos limitantes para o cultivo do arroz. A integração de resistência à doenças com a aplicação de fungicidas permitiu aumento de até 28% na produtividade do arroz, podendo resultar em produtividades superiores a de 3.000kg/ha (PRABHU, 1995), porém a quantidade e diversidade dos agroquímicos utilizados nas lavouras de arroz causam impacto ambiental.

A preocupação sobre o efeito na saúde humana e na contaminação ambiental associada com o uso excessivo de fungicidas no controle de doenças de plantas, assim como o aparecimento de populações de fitopatógenos resistentes, tem contribuído no aumento do interesse em alternativas como o uso do controle biológico (SILVA J. B. T.; MELLO S. C. M., 2007). O tratamento de sementes com fungicidas reduz o inóculo inicial de patógenos, controlando a infecção primária, aumentando o vigor e o estande de plântulas. Porém, as opções de fungicidas registrados são poucas, apresentam baixa atividade residual, e ocorre controle deficiente quando a pressão de inóculo é elevada no campo (SILVA-LOBO, 2008).

A importância da patologia de sementes decorre da eficiência dos métodos de tratamento de sementes desenvolvidos e utilizados, de modo a evitar que a semente infectada leve os patógenos para as áreas de cultivo. A finalidade do controle é evitar a transmissão semente-plântula e manter na lavoura uma intensidade de doença abaixo do limiar de ação. O limiar de ação é aquela incidência da doença na qual as medidas de controle devem ser implementadas para evitar que o limiar de dano econômico seja alcançado (REIS e CARMONA, 2001).

Os testes de sanidade de sementes também podem esclarecer as causas da baixa germinação, comum em amostras com elevados índices de infecção. Um exemplo típico dessa situação é fornecido pelo DIACOM (diagnóstico completo) que esclarece a baixa germinação de sementes de soja (*Glycine max* L.) nos testes de germinação em laboratório, quando estas estão com altos índices de *Phomopsis*

spp. (HENNING e FRANÇA NETO, 1980, 1984). Já na cultura do arroz irrigado não consta pesquisas direcionadas nesta linha para diagnosticar o nível de dano causado por fungos na espermosfera das sementes.

As sementes são degradadas por ampla diversidade de patógenos que interferem no vigor e na germinação das mesmas. Um dos agentes de biocontrole que é atualmente utilizado no tratamento de sementes de culturas comerciais é o fungo do gênero *Trichoderma* spp. Porém, existem poucas pesquisas com relação ao uso desse fungo na cultura do arroz.

Trichoderma spp. apresenta amplitude de ação no antagonismo a fungos. Esses microrganismos são atóxicos ao homem e aos animais e de custo acessível. Não são produzidos de um recurso natural limitado, mas da multiplicação de microrganismos ilimitados na natureza. Além dos já conhecidos efeitos de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de plantas, certas linhagens podem ter efeito estimulatório direto no crescimento e no florescimento de plantas hortícolas (BAKER, 1989).

Isolados de *Trichoderma* spp. exibem variabilidade entre as linhagens com relação a atividade de biocontrole, interferência na germinação e desenvolvimento das plantas cultivadas e adaptabilidade ecológica e ambiental (SILVA, 2000).

Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de avaliar a influência de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de arroz irrigado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* pertencente à Ordem Hypocreales e é representado por fungos não patogênicos, que são habitantes do solo e que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo e/ou antibiose, bem como, por hiperparasitismo (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995)

Trichoderma spp. é um promissor agente de biocontrole. Segundo MELO (1998 apud ETHUR *et al.*, 2001) *Trichoderma* spp. é um fungo natural do solo encontrado especialmente em solos orgânicos, que pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos.

Uma das formas de ação de *Trichoderma* spp. quando do tratamento de sementes é por antibiose. Antibiose que é definida como uma interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos, produzidos por um organismos, têm um efeito danoso sobre o outro (BETTIOL, 1991). Usualmente, ocorre inibição no crescimento e/ou na germinação, podendo ser letal ao hospedeiro. O metabólito produzido por antagonistas podem penetrar na célula e inibirem sua atividade por toxicidade química.

A produção de metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos. Grande parte dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua através de antibiose (BETTIOL, 1991).

Os metabólitos produzidos pode ser voláteis e não-voláteis. Dos antibióticos produzidos por *Trichoderma* spp. BASTOS (1991) cita gliotoxina, viridina e trichodermina, como substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de outros fungos.

2.1.1 Tratamento de sementes com *Trichoderma* spp.

O emprego de produtos sintéticos, de elevados custos e riscos ambientais, para o controle fitossanitário das mais diversas doenças, têm se mantido em evidência devido à resposta rápida que proporciona, bem como por não exigir conhecimento do patossistema envolvido. Na busca por alternativas para estes produtos se encontra os extratos vegetais e o controle biológico, que são

alternativas de interesses econômicos e ecológicos bastante promissoras. Os extratos vegetais e óleos essenciais têm sido fonte de inúmeras pesquisas que ressaltam sua eficiência (SOUZA *et al.*, 2002)

Outra alternativa ao uso de produtos químicos, é a utilização de biopreparados contendo estruturas de propagação do fungo *Trichoderma* spp., saprófita e habitante de solo, que tem se mostrado eficiente por atuar como antagonista de alguns fitopatógenos, podendo ainda ser utilizado como estimulador direto do crescimento e florescimento de plantas (BAKER, 1989).

O produto Trichodermil (Princípio ativo: conídios de *Trichoderma harzianum*, concentração: 2×10^9 conídios viáveis mL⁻¹) testado em tratamento de sementes, nas doses de 80 e 120 mL 100 kg⁻¹ de forma isolada e em todas as doses com adição do fertilizante organomineral, apresenta efeito adicional no estande de plantas de arroz irrigado semeado em época antecipada (MARIOT *et al.*, 2009)

2.1.2 Metabólitos de *Trichoderma* spp.

Metabólitos antifúngicos, muitas vezes, são produzidos por microrganismos que sobrevivem no solo, principalmente fungos, bactérias e actinomicetos, e exercem um grande papel no antagonismo entre microrganismos (MELO, 1991). Dentre os fungos que possuem informação genética para a produção de substâncias inibidoras, antibióticas ou não, destacam-se os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*

A produção de metabólitos tóxicos por espécies de *Trichoderma* foi primeiramente observada por WEINDLING (1934), que determinou haver difusão do princípio letal em hifas jovens. As espécies de *Trichoderma* também produzem exoglucanases e endoglucanases, celobiase e quitinase, que são enzimas importantes na degradação e na lise da parede celular de fungos fitopatogênicos (RIDOUT *et al.*, 1988; PAPAIVIZAS, 1985; ELAD *et al.*, 1982).

2.2 Importâncias do arroz

O arroz é uma gramínea anual importante cultura agrícola, sendo o Rio Grande do sul o maior produtor do Brasil, responsável por 58,9% da produção nacional, (IBGE, 2006). Na cultura do arroz as doenças fúngicas podem causar

perdas que geram instabilidade na produtividade da lavoura, reduzindo em média 10 a 15% do potencial de produção (BALARDIN, 2003).

É amplo o número de fungos que se encontram associados às sementes de arroz, sendo a maioria deles patogênicos à cultura. Entretanto, existem alguns que se destacam em importância econômica e por isto devem ser perfeitamente identificados nos lotes de sementes. Para que se possa identificar com precisão quais os microrganismos patogênicos envolvidos, deve-se dispor de um método adequadamente seguro.

Como consequência desta padronização, destaca-se a introdução do teste sanitário nos laboratórios de análise de sementes, como teste rotineiro, caracterizando de um modo mais exato a qualidade dos lotes de sementes distribuídas aos agricultores (AMARAL *et al*, 1985).

Atualmente, o tratamento de sementes com fungicidas, na cultura do arroz irrigado, é uma ferramenta de manejo largamente utilizada nas lavouras. Porém, o tema ainda gera muitas dúvidas, no que se refere as estratégias para justificativa econômica do seu uso e, poucos trabalhos são realizados em nível de campo. Para o entendimento da resposta da cultura ao tratamento sementes é necessário conhecer as relações fisiológicas da germinação frente ao sistema patógeno-ambiente (GROHS *et al*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui, entre o período de agosto à outubro de 2011.

Para a realização dos experimentos utilizaram-se sementes de arroz irrigado IRGA 424 e PUITÁ INTA CL safra 2010/11 e para o tratamento das sementes de arroz para o experimento relacionado com a germinação foi utilizado o fungicida MAXIM XL[®]. Os lotes de semente e o fungicida foram doados pela empresa Comércio Importação e Exportação de Produtos Agropecuários LTDA - CIAGRO, que é produtora de sementes no município de Itaqui/RS.

3.1 Isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados para desenvolver a pesquisa foram: TI1 – isolado do solo de Itaqui e TM1 isolado do solo de Maçambará, que foram retirados de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* através do método de iscas e selecionados em experimentos *in vitro*, conforme Fipke (2010).

3.2 Fungos da espermosfera de sementes de arroz irrigado

Os fungos veiculados pelas sementes foram isolados das amostras de sementes doadas pela empresa. As sementes foram colocadas em placas de petri contendo meio de cultura do tipo BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e as placas foram colocadas em câmara climatizada, com temperatura de 25 °C ± 1 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 horas luz. Após 5 dias, os fungos de que se desenvolveram a partir das sementes foram repicados para placas de petri contendo meio de cultura do tipo BDA, para ter-se cultura pura.

3.3 Interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pela semente de arroz

A antibiose é uma das formas de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra outros fungos, sendo que os metabólitos secundários podem ser do tipo voláteis e

não voláteis, no caso do trabalho proposto trabalhou-se apenas com os metabólitos não voláteis. Para isso, foi utilizado o teste do papel celofane (ETHUR, 2002).

Foi colocado um disco do tamanho da placa de petri, de papel celofane poroso do tipo torsão (permite a passagem dos metabólitos secundários para o meio de cultura) sobre o meio de cultura do tipo BDA. Posteriormente foi colocado um disco contendo micélio e esporos dos isolados TI1 e TM1 de *Trichoderma* spp., de 6 mm de diâmetro, sobre o papel celofane, na região central da placa.

As placas de petri foram colocadas em câmara climatizada, por 48h, com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 horas luz. Após, o disco foi retirado juntamente com o papel celofane e descartados em um recipiente contendo álcool, para que não ocorresse nenhum tipo de contaminação no meio de cultura. Em seguida foi inserido no centro da placa, sobre os metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. um disco, do tamanho de 6 mm, dos fungos retirados das sementes. A avaliação ocorreu depois de sete dias e constou do diâmetro dos micélios dos fungos retirados das sementes (FIGURA 1).

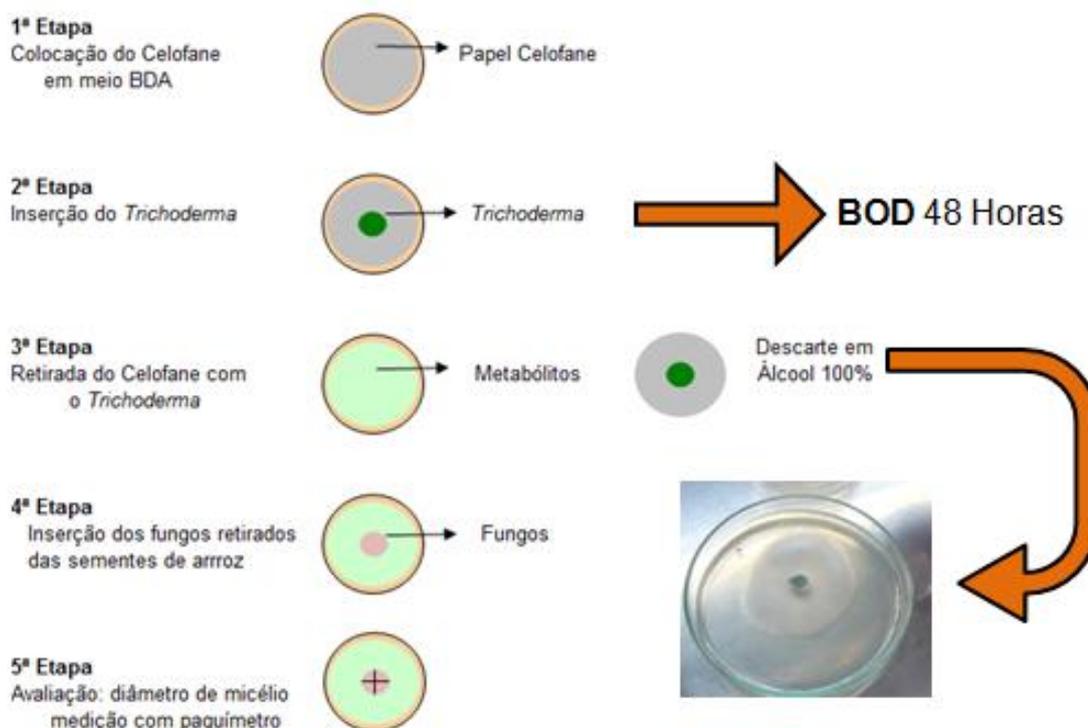


FIGURA 1 – Esquema mostrando as etapas do teste do celofane.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 (Metabólitos não voláteis de dois isolados de *Trichoderma* spp.) x 3 (*Fusarium* spp.; *Bipolaris oryzae*; *Penicillium* spp.). Foi desenvolvido um tratamento testemunha que constou do crescimento do micélio fungico em meio de cultura sem os metabólitos de *Trichoderma*.

3.4 Teste de germinação de sementes de arroz

O teste de germinação foi efetuado seguindo-se a orientação prescrita pelas “Regras para Análise de Sementes” (BRASIL, 1992). Utilizaram-se 200 sementes de cada uma das cultivares IRGA 424 e PUITÁ INTA CL, em quatro repetições de 50 sementes cada, semeadas sobre duas folhas de tamanho 28 x 38 cm de papel para germinação esterilizado e umedecido com água destilada e esterilizada. Posteriormente, foram colocados no germinador em posição vertical sob temperatura de 20 °C ± 1 °C, umidade de 70 % e fotoperíodo de 12 horas luz, conforme BRASIL (2009).

A avaliação do número de sementes germinadas ocorreu após oito dias. A germinação de sementes foi avaliada como sendo o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 2009).

3.5 Teste de assepsia das sementes de arroz

A presença de microrganismos nas sementes pode inviabilizar experimentos que necessitam da sua germinação em meio de cultura. E durante o período das realizações das práticas desse trabalho, observou-se a necessidade de usar algum método para desinfestação das sementes, porque os fungos veiculados pelas sementes estavam se desenvolvendo e assim inviabilizando a germinação e sanidade ideal para o trabalho.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições. Foram utilizadas sementes de arroz irrigado da cultivar PUITÁ INTA CL, sendo que cada tratamento constou de 45 sementes, com cinco repetições de 9 sementes em cada placa. As sementes passaram pela imersão em álcool 96 °GL (por 1 min), hipoclorito de sódio (2 % de cloro ativo), três

recipientes contendo água destilada e esterilizada (por 1min cada) e foram deixadas para secar sobre papel filtro esterilizado, em câmara de fluxo laminar. Os tratamentos constaram de diferentes tempos de imersão das sementes de arroz no hipoclorito de sódio: T1- 1 min, T2- 5 min, T3- 10 min, T4- 15 min e T5- 30 min. O tratamento considerado testemunha foi o de 1min por ser esse o tempo geralmente indicado para testes de assepsia (FIGURA 2).

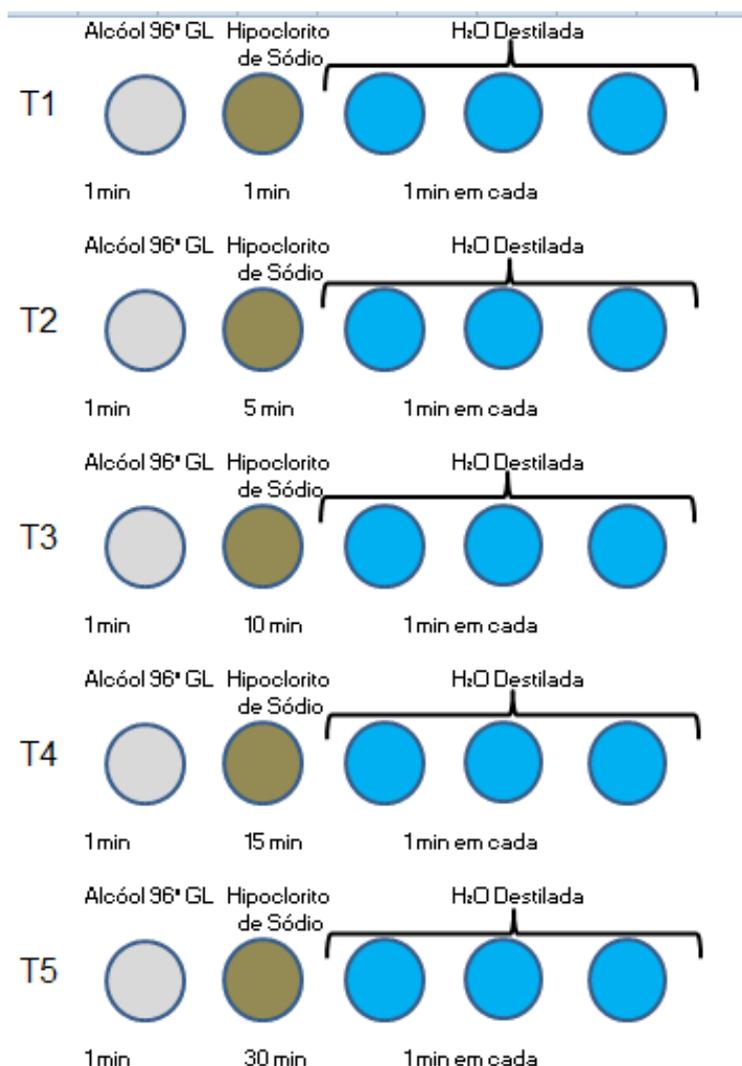


FIGURA 2 – Esquema demonstrando o método de assepsia usado para a desinfestação das sementes de arroz.

Posteriormente, as sementes foram colocadas em placas de petri contendo meio de cultura do tipo BDA + *Cloranfenicol* e as mesmas foram colocadas em câmara climatizada do tipo BOD, sob temperatura de 20 °C ± 1 °C, umidade relativa de 70 % e fotoperíodo de 12 horas luz, durante oito dias.

A avaliação do experimento constou do número de sementes germinadas e não contaminadas, número de sementes germinadas e contaminadas, número de sementes não germinadas e contaminadas e número de sementes não germinadas e não contaminadas.

3.6 Interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. na germinação de semente de arroz.

Foi colocado um disco nas dimensões da placa de petri, de papel celofane poroso sobre o meio de cultura BDA. Posteriormente foi colocado um disco contendo micélio e esporos dos isolados T11 e TM1 de *Trichoderma* spp., de 6 mm de diâmetro, sobre o papel celofane, na região central da placa.

As placas de petri foram colocadas em câmara climatizada, por 48h, com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 horas luz. Posteriormente, o disco contendo *Trichoderma* foi retirado juntamente com o papel celofane e os mesmos foram descartados.

Sobre o meio de cultura contendo apenas os metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* foram inseridos no centro da placa nove sementes de arroz tratadas com o fungicida MAXIN XL[®], na dose de 150 mL PC/100 kg de sementes. Esse fungicida não é recomendado para a cultura do arroz irrigado, porém é utilizado na região da Fronteira Oeste. As cultivares usadas foram IRGA 424 e PUITÁ INTA CL (FIGURA 3).



FIGURA 3 – Disposição das sementes de arroz sobre os metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp.

As placas de petri permaneceram na câmara climatizada por 8 dias, quando foi realizada a avaliação que constou do número de sementes germinadas por placa.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com experimento fatorial 2 (cultivares de arroz) x 2 (metabólitos secundários de dois isolados de *Trichoderma*), com 6 tratamentos e 5 repetições.

3.7 Análise estatística

Os dados percentuais originais foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$. Os dados foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico ASSISTAT.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fungos isolados das sementes de arroz irrigado

Os fungos isolados das sementes de arroz irrigado segundo BARNETT (1998) foram os seguintes: *Fusarium* spp., *Penicillium* spp e *Bipolaris oryzae*. (FIGURA 4)

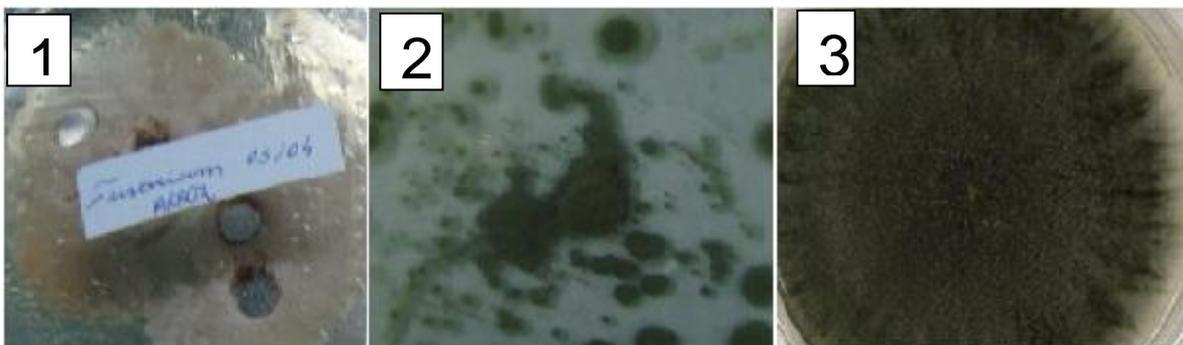


FIGURA 4 – Fungos isolados das sementes de arroz. 1 - *Fusarium* spp.; 2 - *Penicillium* spp.; 3 - *Bipolaris oryzae*.

4.2 Interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pela semente de arroz

De acordo com os resultados, os metabólitos de *Trichoderma* spp. inibiram significativamente o desenvolvimento micelial dos fungos *Fusarium* spp. em até 94% e *Bipolaris oryzae* em até 78%, porém não interferiram no desenvolvimento de *Penicillium* spp. (TABELA 1).

TABELA 1 – Desenvolvimento micelial (cm²) de fungos retirados de sementes de arroz irrigado, crescendo sobre metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	<i>Fusarium</i> spp. (cm ²)	<i>Bipolaris oryzae</i> (cm ²)	<i>Penicillium</i> spp. (cm ²)
Metabólitos não voláteis do isolado TI1	0,77* b	0,36 b	0,65 a
Metabólitos não voláteis do isolado TM1	0,36 b	0,36 b	1,03 a
Testemunha	6,62 a	1,63 a	1,77 a
CV %	50,8	31,74	59,5

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

Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de tomateiros, alface, e fumo, apresentam inibição a *Sclerotinia sclerotiorum* com 94, 93 e 86 % de eficácia, respectivamente sendo sugerido pelo autor que o principal mecanismo de ação foi a antibiose (ETHUR *et al* 2001).

4.3 Teste de germinação de sementes de arroz

Para o teste de germinação de sementes de arroz observou-se que a cultivar IRGA 424 apresentou 92,5% e a cultivar PUITÁ INTA CL apresentou 94,5% de germinação. Portanto, as sementes apresentaram índices de germinação considerados satisfatórios para o desenvolvimento dos experimentos.

4.4 Teste de assepsia das sementes de arroz

A avaliação para esse teste foi com relação ao número de sementes: germinadas e contaminadas, germinadas e não contaminadas, não germinadas e contaminadas e não germinadas e não contaminadas, por tratamento.

Observou-se que para as sementes germinadas e não contaminadas não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, porém para não germinadas e não contaminadas o tempo de assepsia de 30 minutos em hipoclorito de sódio ocasionou um aumento significativo de até 36% quando comparado com os demais (TABELA 2). Assim, o tempo de exposição de 30 minutos ao hipoclorito de

sódio interferiu na germinação de sementes de arroz, não sendo indicado para assepsia das sementes. De acordo com Ribeiro (2008) a utilização de hipoclorito de sódio por dez minutos como forma de assepsia reduz o processo de germinação de sementes de arroz e diminui a perda de água.

TABELA 2 – Germinação e contaminação (%) de sementes de arroz imersas em hipoclorito de sódio a 2% por cinco tempos e colocadas em meio de cultura BDA.

Tratamentos	Sementes de arroz em meio de cultura			
	Germinada e contaminada (%)	Não germinada e contaminada (%)	Germinada e não contaminada (%)	Não germinada e não contaminada (%)
Assepsia 1 minuto	62 ab*	32 a	06 a	00 b
Assepsia 5 minutos	72 ab	16 ab	12 a	00 b
Assepsia 10 minutos	60 ab	08 ab	18 a	14 ab
Assepsia 15 minutos	76 a	06 b	10 a	08 ab
Assepsia 30 minutos	44 b	16 ab	18 a	22 a
CV%	18,5	54,1	100,0	99,5

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de 5 placas contendo 9 sementes cada.

Para as sementes germinadas e contaminadas ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que a exposição de 15 minutos ao hipoclorito de sódio apresentou um aumento de 5 a 42 % quando comparado aos demais tratamentos (TABELA 2). Para as sementes não germinadas e contaminadas, observaram-se diferenças significativas sendo que para o tratamento com 1 minuto de exposição ao hipoclorito de sódio apresentou aumento de 50 a 81% quando comparado com os demais tratamentos (TABELA 2). Assim, o tempo de 1 minuto de assepsia que geralmente é indicado para desinfestação de materiais botânicos que são colocados em meio de cultura, não foi adequado para conter a contaminação.

Portanto, o tempo ideal de imersão das sementes de arroz ao hipoclorito de sódio indicado para a sua germinação em meio de cultura é de 15 minutos, porém ocorrendo contaminação em todos os tratamentos.

4.5 Interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. na germinação de semente de arroz.

Não ocorreu interação entre os fatores diferente cultivares e metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. e não ocorreram diferenças significativas para as diferentes cultivares e nem para os diferentes isolados de *Trichoderma* (TABELA 3).

TABELA 3 – Germinação de sementes de arroz irrigado sobre metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp.

Cultivares de Arroz	Germinação (%)		
	T11	TM1	Testemunha
IRGA 424	58,1 ^{ns}	65,8 ^{ns}	60,9 ^{ns}
PUITÁ INTA CL	64,3 ^{ns}	60,9 ^{ns}	62,3 ^{ns}

T11 e TM1 = Metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* spp.

NS = Não significativo ao Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

5 CONCLUSÃO

Os metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* spp. interferem no desenvolvimento dos fungos *Fusarium* spp. e *Bipolaris oryzae*, entretanto não interferem no desenvolvimento de *Penicillium* spp., *in vitro*.

Os metabólitos secundários dos isolados de *Trichoderma* spp. não interferem na germinação das sementes de arroz das cultivares IRGA 424 e PUITÁ INTA CL.

6 REFERÊNCIAS

ALONÇO *et al.* **Importância Econômica, Agrícola e Alimentar**, 2006. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>>. Acesso em: 15 Jul. 2011.

AMARAL, H. M., *et al.* **DIAGNÓSTICO DA PATOLOGIA DE SEMENTES DE ARROZ NO BRASIL**. Revista Brasileira de Sementes, vol. 7, n. 1, p. 183-188, 1985

BAKER, R. **Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity**. Oxford: Trends of Biotechnology. vol. 7, p. 34-38, Feb. 1989.

BALARDIN, R. S. **Doenças do arroz**. Orium: Santa Maria, 2003. p. 53

BARNETT, H. L. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York, 1997, p. 216

BASTOS, C. N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauzeiro. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 3-5, 1991.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *et al.* (Eds). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 1995. vol. 1, p. 46-95.

BETTIOL, W. **Componentes do controle biológico de doenças de plantas**. In: **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 3-5, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análises de sementes/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.399p.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. **Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum***. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v.28, p.719-725, 1982.

ETHUR, L. Z. **Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary por isolados de *Trichoderma viride* no pepineiro**. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Programa de Pós-Graduação em Agronomia), 2002. UFSM, Santa Maria, 2002.

ETHUR, L. Z. *et al.* **Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro**. Ciência Rural vol. 31 n. 5 Santa Maria. Setembro/Outubro. 2001

FIPKE, G. M. **Seleção de fungos antagonistas ao fitopatógeno *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary provenientes de solos da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul**. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Agronomia, Universidade Federal do Pampa, RS, 2010.

GROHS, D.S., *et al.* **Análise conjunta de ensaios comparativos da reposta do tratamento de sementes com fungicida sobre o estabelecimento e produtividade de arroz irrigado.** XII Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado. Balneário Camburiu-SC. Itajaí: Epagri/SOSBAI. 2011, Ed. n. 7, p. 24.

HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. de B. **Problemas na avaliação de germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* SP.** Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v. 2, n. 5, p. 9-22, 1980.

HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. de B. **Effect of *Phomopsis* spp. on soybean seed quality in Brazil.** In: Conference on the Diaporthe / Diaporthe disease complex on Soybean, 1984, Fort Walton Beach. Proceedings. Springfield, 1984. P. 7-66.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **A produção brasileira de cereais, leguminosas e oleaginosa de 2006**, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pamclo/2002_2006/comentario.pdf>. Acesso em: 15 Jul. 2011.

MARIOT, C. H. P. *et al.* **Avaliação do uso de *trichoderma* em tratamento de sementes na cultura do arroz irrigado.** IRGA: Cacheoerinha do Sul – RS. p. 435-439, 2009

MELO, I. S. **Potencialidades na utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas.** In: BETTIOL, W. (ed) Controle biológico de doenças de plantas. Brasília: EMBRAPA/CNPMA, p.135-156, 1991.

PAPAVIZAS, G.C. ***Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol.** Annual Review of Phytopathology, v.23, p.23-54, 1985.

PRABHU, A. S. **Situação atual do arroz de sequeiro e estratégias de controle.** Fitopatologia Brasileira. p. 277. 1995.

REIS, E. M. & CARMONA, M. **Avaliação do potencial de rendimento de lavouras de trigo com vistas ao controle econômico de doenças foliares com fungicidas.** Universidade de Passo Fundo, 2001, p. 28.

RIDOUT, C.J.; COLEY-SMITH, J.R.; LYNCH, J.M. **Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*.** Enzyme and Microbial Technology, v.10, p.180-187, 1988.

RIBEIRO, M. F., *et al.* **Influência do hipoclorito de sódio na germinação e vigor desementes de arroz (*Oryza sativa* L.).** Pelotas-RS: UFPel. p. 4 2008.

SABINO, M.; INOMATA, E. I.; LAMARCO, L. C. A. **Variação dos níveis de aflatoxina B1B em pasta de amendoim e paçoca consumidas no estado de São Paulo.** Revista Instituto Adolfo Lutz, vol. 42, n. 1/2, p. 39-44, 1982.

SILVA J. B. T.; MELLO S. C. M. **Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, p. 17, 2007.

SILVA-LOBO, V. L. **Efeito do tratamento químico de sementes de arroz no controle da brusone nas folhas e na qualidade sanitária e fisiológica das sementes.** Tropical Plant Pathology, Brasília, v. 33 n. 2, p. 162-166, 2008.

SILVA, P.R.Q. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil.** Tese de doutorado, Brasília, UnB, 130p., 2000.

SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil.** Bento Gonçalves, RS. Porto Alegre: SOSBAI. p. 188, 2010.

SOUZA, M. A. A., BORGES, R. S. O. S., STARK, M. L. M. & SOUZA, S. R. **Efeito de extratos aquosos, metanólicos e etanólicos de plantas medicinais sobre a germinação de sementes de alface e sobre o desenvolvimento micelial de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola** Revista Universidade Rural 2002. vol. 22 p.181-185.

WEINDLING, R. **Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi.** Phytopathology, v.24, p.1153-1179, 1934.