

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

**INTERFERÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Trichoderma* spp. NA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA SANITIZADAS E FUNGOS
ENCONTRADOS NA ESPERMOSFERA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Daiane Mendes Boeira

**Itaqui, RS, Brasil
2011**

Daiane Mendes Boeira

INTERFERÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Trichoderma* spp. NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA SANITIZADAS E FUNGOS ENCONTRADOS NA ESPERMOSFERA

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 **em Engenharia Agrônoma**.

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

Itaqui, RS, Brasil

Boeira, Daiane Mendes.

Interferência de metabólitos secundários de *Trichoderma spp.* na germinação de sementes de soja sanitizadas e fungos encontrados na espermosfera/Daiane Mendes Boeira. Itaqui, 22 de dezembro de 2011.

31 folhas: tamanho (30 cm)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia)
Universidade Federal do Pampa, Itaqui, 22 de dezembro de 2011. Orientação: Dr^a. Luciana Zago Ethur.

1. *Glycine max* (L.) 2. Controle biológico 3. *Trichoderma spp.* I.
Boeira, Daiane Mendes. II. Interferência de metabólitos secundários de *Trichoderma spp.* na germinação de sementes de soja sanitizadas e fungos encontrados na espermosfera

Daiane Mendes Boeira

**INTERFERÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Trichoderma* spp. NA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA SANITIZADAS E FUNGOS
ENCONTRADOS NA ESPERMOSFERA**

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
Engenheiro(a) Agrônomo(a).

Trabalho de Conclusão de Curso defendido em: 22 de dezembro de 2011.
Banca examinadora:

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

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

Prof^o. Dr^o. Osmar Damian Prestes
Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UNIPAMPA

Dedico especialmente este trabalho à minha família, que foi, e sempre será a base que me manterá de pé, diante das adversidades que encontrarei neste longo caminho a percorrer. Ao meu namorado, que me ajudou em todos os momentos da graduação e aos amigos que são poucos, mas são os melhores...

AGRADECIMENTO

Primeiramente à DEUS, acima de tudo e todos...

A minha mãe, Zulma, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos, nome este que vou pronunciar com todo o orgulho até o fim de minha vida...

A Professora Dr^a Luciana Zago Ethur, pela orientação e por acreditar no meu trabalho e na capacidade que teria, para fazê-lo da melhor forma.

Aos professores da graduação que se fazem presentes no corpo docente deste Campus, em especial aos da banca avaliadora, pela valiosa contribuição.

Aos demais professores ficam a minha gratidão pelos ensinamentos e exemplos de dedicação e coragem de enfrentar ao longo destes cinco anos dificuldades, mas tirá-las como ensinamento e alimento para seguir lutando por uma causa em comum.

Aos colegas em especial a Nathali Cosentino que foi minha companheira, em momentos de alegrias e tristezas ao longo destes cinco anos.

Ao Lucas Martini, que me auxiliou neste trabalho com dedicação e responsabilidade e com quem sempre pude contar nestes cinco anos de graduação.

À Caroline Pereira, minha colega de estágio, que demonstrou apoio e amizade nestes momentos finais de escrita do TCC.

Que essas amizades perdurem por muitos e muitos anos.

E meu agradecimento a todos aqueles que não foram citados, mas que de maneira direta, ou indireta contribuíram para a minha formação, e que com toda a certeza serão sempre lembrados.

“Tenha fé...
acredite em
DEUS e em você.
Isso basta! “
(D.M.B)

RESUMO

INTERFERÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Trichoderma* spp. NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA SANITIZADAS E FUNGOS ENCONTRADOS NA ESPERMOSFERA

Autor: Daiane Mendes Boeira

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

Local e data: Itaquí, 22 de dezembro de 2011.

Na cultura da soja entre os principais fatores que limitam o rendimento da cultura, as doenças fúngicas estão entre os mais importantes e de difícil controle. O uso de sementes contaminadas, originadas de diferentes áreas de produção, tem sido uma das mais importantes causas da introdução e aumento de novas doenças ou de raças fisiológicas de patógenos. O fungo *Trichoderma* spp. vem ganhando destaque e sendo utilizado como alternativa no tratamento de sementes de várias culturas comerciais com fins sanitários e de desenvolvimento de plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interferência dos metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. na germinação de sementes de soja sanitizadas e fungos veiculados pelas sementes. Para isso, foram utilizados dois isolados (TI1 e TM1) de *Trichoderma* spp. e realizado os seguintes testes e experimentos: teste padrão de germinação das sementes de soja das cultivares FUNDACEP 61RR e 57RR, isolamento de fungos veiculados pelas sementes, interferência dos metabólitos no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes, sanitização das sementes utilizando diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio e a interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. na germinação das sementes de soja. Como resultados foram encontrados os fungos: *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp. nas sementes de soja e ocorreu interferência dos metabólitos não voláteis dos dois isolados de *Trichoderma* spp. inibindo o desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp veiculados as sementes de soja, e os metabólitos do isolado TI1 inibiram a germinação das sementes de soja das cultivares FUNDACEP 61RR e 57RR enquanto os do TM1 inibiram a germinação da cultivar 57RR. Portanto, os metabólitos secundários liberados pelos isolados de *Trichoderma* spp. testados, interferem no

desenvolvimento dos fungos *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp veiculados pelas sementes e o isolado T11 inibe a germinação das sementes testadas, enquanto o TM1 apenas inibiu a germinação da cultivar 57RR.

Palavras-chave: *Glycine Max* (L.), controle biológico, *Trichoderma* spp.

ABSTRACT

Author: Daiane Mendes Boeira

Advisor: Dr^a. Luciana Zago Ethur

Place and date: Itaquí, December 22, 2011.

INTERFERENCE SECONDARY METABOLITES OF *Trichoderma* spp. ON THE GERMINATION OF SOYBEAN SEEDS SANITIZER AND FUNGI FOUND IN ESPERMOSFERA

In soybean among the main factors limiting the yield of soybean fungal diseases are among the most important and difficult to control. The use of contaminated seeds, originating from different areas of production, has been one of the most important causes for the introduction and rise of new diseases or physiological races of pathogens. *Trichoderma* spp. has been gaining momentum and being used as an alternative in the treatment of seeds of various crops for medical purposes and development of plants. The objective of this study was to evaluate the interference of secondary metabolites of *Trichoderma* spp. germination of soybean seeds sanitized and fungi transmitted by seeds. For this study, two isolates (TI1 and TM1) of *Trichoderma* spp. and performed the following tests and experiments: the pattern of seed germination of the soybean cultivars FUNDACEP 61RR and 57RR, isolation of fungi transmitted by seeds, interference of metabolites in the development of fungus transmitted by seeds, seed sanitization using different immersion times in sodium hypochlorite and interference from non-volatile metabolites of *Trichoderma* spp. the germination of soybean seeds. As results were found fungi: *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp and *Penicillium* spp. in soybean seeds and there was no interference of volatile metabolites from two isolates of *Trichoderma* spp. inhibiting the mycelial growth of *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp and *Penicillium* spp conveyed soybean seeds, and the metabolites isolated TI1 inhibited seed germination of the soybean cultivars FUNDACEP 61RR and 57RR while the TM1 inhibited germination of cultivar 57RR. Therefore, secondary metabolites released by *Trichoderma* spp. tested, interfere with development of *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp and *Penicillium* spp transmitted by seeds and isolated TI1 inhibits

the germination of the seeds, while the TM1 only inhibited germination of cultivar 57RR.

Key words: *Glycine max* (L.), biological control, *Trichoderma* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fungos isolados das sementes de soja. 1- <i>Aspergillus</i> spp.;	
2- <i>Cladosporium</i> spp e 3- <i>Penicillium</i> spp	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenvolvimento micelial (cm ²) de fungos retirados de sementes de soja, crescendo sobre metabólitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	21
Tabela 2: Germinação (%) de sementes de soja imersas em hipoclorito de sódio a 2% por cinco tempos e colocadas em meio de cultura BDA.....	22
Tabela 3: Germinação de sementes de duas cultivares de soja sobre metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp.....	23

LISTA DE SIGLAS

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 A Cultura da soja.....	12
2.2 <i>Trichoderma</i> spp.....	13
2.3 Fungos veiculados por sementes de soja.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Local de realização.....	15
3.2 Sementes.....	15
3.3 Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	15
3.4 Teste Padrão de germinação.....	16
3.5 Isolamento de fungos veiculados pelas sementes.....	16
3.6 Interferência dos metabólitos de <i>Trichoderma</i> spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes de soja.....	16
3.7 Sanitização de sementes de soja.....	17
3.8 Interferência de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. na germinação de sementes de soja.....	18
3.9 Análise estatística.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Germinação de cultivares de soja.....	20
4.2 Fungos isolados das sementes de soja.....	20
4.3 Interferência de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes de soja.....	21
4.4 Teste de assepsia das sementes de soja.....	22
4.5 Interferência de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. na germinação de sementes de soja.....	22
5 CONCLUSÃO	24
6 REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max (L.) Merrill*), é originária da Ásia, mais precisamente da China e, somente no século XIX, iniciou-se o seu cultivo na América Latina. Um dos principais produtos agrícolas nacionais ocupa lugar de destaque no País, gerando importante fonte de divisas (ITO & TANAKA, 1993).

Na cultura da soja, a obtenção de uma lavoura com população adequada de plantas depende da correta utilização de diversas práticas. O bom preparo do solo, a semeadura na época adequada, a utilização correta de herbicidas e a boa regulação da semeadura são práticas essenciais. O sucesso dessas práticas está condicionado à utilização de sementes de boa qualidade. Todavia, freqüentemente, a semeadura não é realizada em condições ideais, o que resulta em sérios problemas de emergência, havendo muitas vezes, a necessidade de ressemeadura (EMBRAPA, 1996). Além destes fatores, existem fungos patogênicos que podem se associar às sementes de soja durante o seu desenvolvimento ou após a maturação (CHRISTENSEN, 1972).

O tratamento de sementes é usado principalmente com a finalidade de permitir a germinação de sementes infectadas, controlar patógenos transmitidos pela semente e proteger as sementes dos fungos do solo (HENNING et al., 1994). Além de conferir proteção às sementes, o tratamento de sementes oferece garantia adicional ao estabelecimento da lavoura a custos reduzidos, menos de 0,5% do custo de instalação da lavoura (HENNING, 2005).

Diante desta realidade, dá-se o valor a estudos que minimizem estas perdas de produção por ataques de agentes patogênicos veiculados a sementes, usando métodos alternativos que sejam menos poluentes, tóxicos e sem poder residual ao meio ambiente. Vários produtos bioprotetores estão sendo comercializados e recomendados para o tratamento de sementes de soja o contrário do que ocorre com os fungicidas químicos, as informações geradas pela pesquisa na área de tratamento de sementes com fungicidas biológicos ainda são escassas (MERTZ et al. 2009).

Os mecanismos de ação pelos quais o *Trichoderma* spp. pode atuar são: antibiose, hiperparasitismo, competição, indução de defesa da planta e também em alguns casos através de promoção de crescimento (MELO, 1996).

O fungo *Trichoderma* tem uma capacidade superior para mobilizar e obter nutrientes do solo em comparação com outros organismos. O uso eficiente de nutrientes disponíveis é baseado na habilidade do *Trichoderma* em obter ATP do metabolismo de diferentes açúcares, tais como os derivados de polímeros amplamente distribuídos na natureza, como celulose, glucanos, quitina entre outros (CHET et al., 1997).

A antibiose é uma das formas de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra outros fungos e os metabólitos secundários liberados pelo agente de controle biológico podem ser do tipo voláteis e não voláteis (ETHUR, 2002), com amplo espectro de atividade antimicrobiana, que impedem a colonização por outros microrganismos. Dentre esses metabólitos estão compostos de baixo peso molecular e antibióticos, muitos já identificados e estudados (RIBEIRO, 2009). Uma vez em contato, *Trichoderma* spp. ataca o fungo antagonizado podendo se enrolar em torno de suas hifas, e através da formação de apressórios e, portanto, da produção de diferentes enzimas de degradação de parede celular (CHET et al., 1998)

De acordo com o exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a interferência de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. na germinação de sementes de soja sanitizadas e fungos veiculados pelas sementes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura da Soja

A soja é uma leguminosa com característica herbácea, pertencente à família *Leguminosae* e ao gênero *Glycine* que abrange cerca de quinze espécies. Sua fácil adaptação aos diversos tipos de clima e fotoperíodo, devido a suas inúmeras variedades, a colocam entre as principais oleaginosas do mundo, sendo entre elas a mais cultivada (BARRETOS, 2008).

Segundo dados apresentados pelo USDA (2010), o Brasil é o segundo produtor mundial de soja, a qual é uma das mais importantes culturas para o agronegócio brasileiro. A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura de grande

importância econômica e social no Brasil, sendo a semente o insumo de maior relevância (GOMES et al., 2009).

A cultura da soja no Brasil recebe grande atenção da pesquisa, principalmente visando à obtenção de informações que possibilitem aumentos de produtividade. Para conseguir maiores rendimentos por área, é indispensável, dentre as técnicas adequadas de cultivo, a utilização de sementes de alta qualidade, expressa pelos componentes genético, físico, fisiológico e sanitário (BRACCINI et al., 2003).

O desenvolvimento de cultivares de soja com adaptação às condições edafo-climáticas das principais regiões do País, especialmente as dos cerrados e as de baixas latitudes vem também propiciando nas últimas três décadas, a expansão da fronteira agrícola brasileira. Cultivares melhoradas portadoras de genes capazes de expressar alta produtividade, ampla adaptação e boa resistência/tolerância a fatores bióticos ou abióticos adversos representam usualmente a contribuição mais significativa à eficiência do setor produtivo (EMBRAPA, 2004).

2.2 *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. é um fungo natural do solo encontrado especialmente em solos orgânicos, que pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (MELO, 1998). Pertence a classe Deuteromicetos, sub-classe *hifomiceto*, da ordem *Moniales*, e família *Moniliaceae*. Este fungo caracteriza-se pela grande produção de conídios (esporos), a partir de conidióforos que se originam diretamente das hifas. Dentre os muitos agentes potenciais de biocontrole, *Trichoderma* spp. tem sido um dos mais estudados, dado suas características peculiares de antagonismo (MELO, 1998).

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). 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. Alguns, ainda, podem persistir no solo ou nas plantas, podendo dispensar reaplicações (FARIA et al., 2003)

Segundo Melo (1998) muitas espécies de *Trichoderma* spp. já estudadas possuem a capacidade de produzir metabólitos tóxicos, tais como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir propágulos de fungos fitopatogênicos.

O controle biológico obtido com o uso de isolados de *Trichoderma* spp. é definido pelo resultado final de um complexo de diferentes mecanismos, que atuando sinergicamente, levam ao controle de doenças. O biocontrole se dá tanto pela competição por nutrientes e espaço, quanto pela habilidade dos isolados de produzir e/ou resistir a metabólitos que podem impedir a germinação de esporos (fungistasia), matar as células (antibiose), ou modificar a rizosfera, como a acidificação do solo fazendo com que o crescimento dos patógenos seja inibido (RIBEIRO, 2009).

Formulações de isolados e tecnologias de aplicação utilizando o antagonista *Trichoderma* spp. como biocontrolador, tem sido estudados visando metodologias para o controle de determinados fitopatógenos (MESQUITA, 2011).

2.3 Fungos veiculados por sementes de soja

Doenças de plantas desempenham papel significativo em prejuízos causados na agricultura. Em particular, fungos de solo são responsáveis por perdas importantes em todos os tipos de cultivos agrícolas. Além disso, não só as lavouras, mas produtos pós-colheita também sofrem com infecções fúngicas. As doenças são componentes constantes de qualquer agrossistema e, para que ocorram é necessária a interação de três fatores, sendo eles: ambiente com condições de temperatura e umidade favoráveis; o patógeno em quantidade adequada, ativo e por período prolongado; e a presença do hospedeiro susceptível, representado por plantas ou partes de uma planta, normalmente em grande extensão (KIMATI & BERGAMIN FILHO, 1995). Segundo Henning (1987) os fungos de armazenamento como o *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., são os mais comumente associados às sementes e estão entre os principais agentes de deterioração.

Berjak (1987) cita que, segundo estatísticas da FAO, 5 a 30% das sementes são perdidas anualmente, devido à atuação destes microorganismos, afetando germinação e vigor.

A semente é um insumo de grande relevância no processo produtivo e sua qualidade é indispensável à implantação de lavouras conduzidas tecnicamente. A qualidade de um lote de sementes compreende uma série de características ou de atributos que determinam o seu valor para a semeadura; dentre os mais relevantes, são considerados os de natureza genética, fisiológica e sanitária (MARCOS FILHO, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui, entre o período de agosto a outubro de 2011.

3.2 Sementes

Para a realização do experimento utilizaram-se sementes de soja transgênica FUNDACEP 61RR e FUNDACEP 57RR, safra 2010/11, provenientes do banco de sementes do Campus Itaqui/UNIPAMPA.

3.3 Isolados de *Trichoderma spp.*

Os isolados de *Trichoderma spp.* (T11 – isolado do solo de Itaqui e TM1 isolado do solo de Maçambará) utilizados para desenvolver este trabalho são pertencentes à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui. Os isolados de *Trichoderma spp.* foram retirados de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* através do método de iscas e selecionados em experimentos *in vitro*, conforme Fipke (2010).

3.4 Teste Padrão de germinação

O teste padrão de germinação foi efetuado seguindo-se a orientação prescrita pela RAS (Regras para Análise de Sementes) (BRASIL, 1992). Onde foram utilizadas 200 sementes de cada cultivar, FUNDACEP 57 RR E FUNDACEP 61RR, em quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de tamanho 28 x 38 cm de papel germitest, previamente esterilizados e umedecidos com três vezes o peso do papel em volume de água.

Posteriormente, os rolos contendo as sementes foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos no germinador em posição vertical sob temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi efetuada no oitavo dia a contagem das plântulas normais (BRASIL, 1992). 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 Isolamento de fungos veiculados pelas sementes

Para o isolamento dos fungos veiculados pelas sementes, utilizou-se o mesmo lote de sementes das cultivares FUNDACEP 57RR e FUNDACEP 61RR.

As sementes foram distribuídas em placas de petri contendo meio de cultura do tipo BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com Cloranfenicol (antibiótico de amplo espectro, sendo eficaz contra bactérias) na proporção de 1 mL/L^{-1} e colocadas em câmara climatizada, com temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após oito dias, os fungos que se desenvolveram a partir das sementes foram isolados e repicados para placas de petri contendo meio BDA, para obter-se a cultura pura e serem identificados em nível de gênero. Os fungos foram identificados utilizando-se microscópio óptico e literatura (BARNETT, 1972).

3.6 Interferência dos metabólitos de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes de soja

Para avaliar-se a interferência dos metabólitos secundários de *Trichoderma* spp., foi utilizado o teste do papel celofane (ETHUR, 2002).

Para o desenvolvimento da técnica foi utilizado um disco de papel celofane poroso do tipo torção (que permitiu a passagem dos metabólitos secundários para o meio de cultura), do tamanho da placa de petri. Este foi colocado sobre o meio de cultura do tipo BDA previamente vertidos em placas de petri. Posteriormente foi transferido um disco contendo micélios e esporos dos isolados T11 e TM1 de *Trichoderma*, de 6 mm de diâmetro, sobre o papel celofane, na região central da placa.

As placas de petri foram incubadas 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. Passado o tempo necessário para o desenvolvimento do fungo, quando o micélio atingiu um crescimento de dois terços da placa, 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*, um disco do tamanho de 6 mm, dos fungos isolados das sementes. A avaliação ocorreu após sete dias e constou do diâmetro dos micélios dos fungos.

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

3.7 Sanitização de sementes de soja

Durante a realização do experimento observou-se a necessidade de utilizar-se um método que fosse eficaz para desinfestação das sementes devido a quantidade de fungos veiculados a elas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. Foram utilizadas sementes de soja da cultivar FUNDACEP 61RR, sendo que cada tratamento constou de 35 sementes, com cinco repetições de 7 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 1 min. 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 soja no hipoclorito de sódio: T1- 1 min, T2- 5 min, T3- 10 min e T4- 15 min. O tratamento considerado testemunha foi o de 1min por ser esse o tempo geralmente indicado para testes de assepsia .

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 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 germinadas.

3.8 Interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. na germinação de sementes de soja

Foi colocado um disco nas dimensões da placa de petri, de papel celofone 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 sete sementes de soja tratadas devidamente sanitizadas com o tempo de cinco minutos.

As placas de petri permaneceram na câmara climatizada por oito 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 soja) x 2 (metabólitos secundários de dois isolados de *Trichoderma*), com 5 repetições.

3.9 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 Germinação de cultivares de soja

Ao analisar o teste de germinação de sementes de soja constatou-se que a cultivar Fundacep 57 RR apresentou 81% e a cultivar Fundacep 61 RR apresentou 93% de germinação. Contudo, as sementes analisadas apresentaram índices de germinação considerados satisfatórios para o desenvolvimento dos experimentos.

4.2 Fungos isolados das sementes de soja

Os fungos isolados das sementes de soja foram: *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp.(FIGURA 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Patricio et al. (1991) que verificaram, também, uma elevada incidência de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em sementes de soja, principalmente em amostras com germinação abaixo de 75%, não sendo encontrada, no entanto, correlação entre esses fatores.

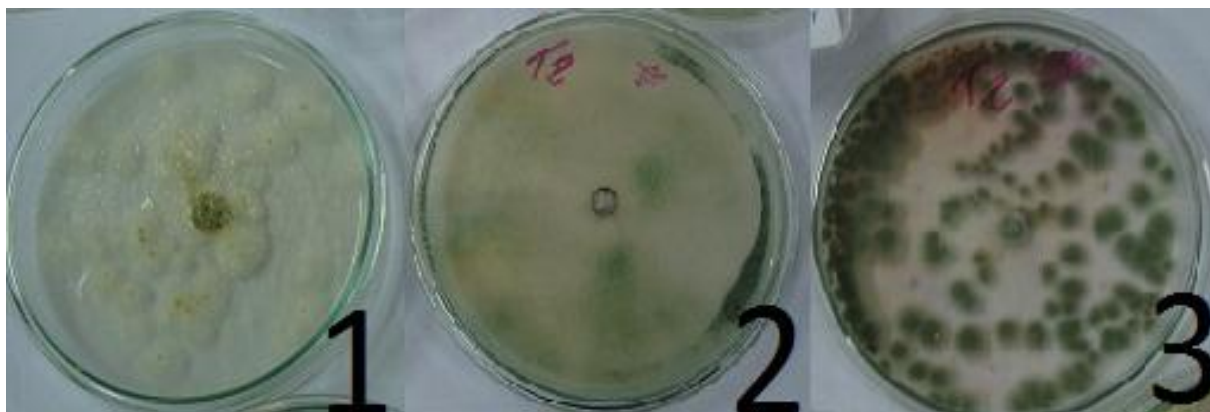


FIGURA 1- Fungos isolados das sementes de soja. 1- *Aspergillus* spp.; 2 - *Cladosporium* spp e 3- *Penicillium* spp

4.3 Interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes de soja

Logo após o isolamento dos fungos, foram analisadas a interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes de soja.

Ocorreu interação entre os fatores metabólitos secundários de isolados de *Trichoderma* e fungos veiculados pelas sementes (TABELA 1). Para os fungos isolados das sementes *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp. ocorreu inibição no desenvolvimento micelial na presença dos metabólitos não voláteis dos isolados TI1 e TM1 de *Trichoderma*, quando comparado ao tratamento testemunha, na proporção de 53%, 64% e 85%, respectivamente (TABELA 1).

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

Tratamentos	<i>Penicillium</i> spp.(cm ²)	<i>Aspergillus</i> spp. (cm ²)	<i>Cladosporium</i> spp. (cm ²)
Testemunha	1,7 aC*	2,8 aB	4,6 aA
TI1	0,8 bA	0,8 bA	0,7 bA
TM1	0,6 bA	1,0 bA	0,4 bA
CV (%)			26,36%

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Não ocorreram diferenças significativas para o desenvolvimento micelial dos fungos veiculados pelas sementes, na presença dos metabólitos liberados pelos dois isolados de *Trichoderma*. Porém, ocorreu diferença no desenvolvimento micelial dos fungos quanto ao tratamento testemunha, sendo que o fungo *Cladosporium* spp. apresentou maior desenvolvimento na proporção de 39% e 63%, quando comparado com os fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., respectivamente.

4.4 Teste de assepsia das sementes de soja

Quanto à assepsia não ocorreram diferenças significativas para as avaliações de sementes germinadas e não germinadas (TABELA 2). Assim observou-se que o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio não interferiu na germinação e auxiliou na desinfestação de sementes de soja. Ao contrário do que foi observado por Zorato et.al (2001) que utilizando Hipoclorito de sódio, Q-boa®, Brilhante® e Agrotensil®, não constataram eliminação de agentes infestantes presentes nas sementes de soja.

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

Tratamentos	Sementes germinadas (%)	Sementes não germinadas (%)
Tempo Assepsia		
1"	85,7 a*	14,3 a
5"	77,1 a	22,9 a
10"	74,2 a	25,8 a
15"	77,1 a	22,9 a
CV %	11,4	51,2

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Para a soja o tempo de exposição ao hipoclorito está de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) que indica a assepsia superficial com hipoclorito de sódio (NaOCl), na concentração de 1%, por três minutos. Um tempo maior de imersão no hipoclorito causaria danos ao tegumento da semente.

4.5 Interferência de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. na germinação de sementes de soja

Ocorreu interação entre os fatores cultivares de soja e metabólitos secundários de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. (TABELA 3). Os metabólitos secundários do isolado TI1 de *Trichoderma* inibiram a germinação das duas cultivares de soja, porém o isolado TM1 não interferiu na germinação da cultivar FUNDACEP 61RR, quando comparado com tratamento testemunha (TABELA 3).

TABELA 3 – Germinação de sementes das duas cultivares de soja sobre metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp.

Metabólitos secundários de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Cultivares de Soja	
	Fundacep 57RR (%)	Fundacep 61RR (%)
TI1	0 bA*	0 bA
TM1	4 bB	68 aA
Testemunha**	34 aB	92 aA
CV (%)	42,36	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

** Testemunha sem metabólitos

Ocorreram diferenças significativas quanto à germinação das cultivares de soja sendo que a cultivar FUNDACEP 61RR apresentou maior potencial de germinação no tratamento testemunha de 63% e na presença dos metabólitos do isolado TM1 de *Trichoderma* de 94%. A justificativa para a inibição pode ser os tipos de metabólitos liberados pelas diferentes espécies de *Trichoderma*; o uso da técnica *in vitro*; os fatores abióticos que podem ter influenciado na liberação dos metabólitos, como a temperatura, umidade, pH entre outros. Entretanto, Junges et al. (2007) constatou que o bioprotetor *Trichoderma* spp. na formulação líquida, prejudicou a germinação das sementes de arroz, ainda Ousley et al. (1993 apud Ethur 2006) observaram que alguns isolados de *T. harzianum* auxiliaram e outros inibiram a germinação de sementes de alface.

Observou-se que existe necessidade de estudos buscando outras metodologias para avaliar-se a ação de metabólitos secundários de *Trichoderma* sobre a germinação de sementes de soja.

5 CONCLUSÃO

Os metabólitos secundários dos isolados TI1 e TM1 de *Trichoderma* spp. inibem o desenvolvimento micelial dos fungos *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp, isolados das sementes de soja.

Os metabólitos secundários do isolado TI1 de *Trichoderma* spp. inibem a germinação das sementes de soja das cultivares FUNDACEP 61RR e 57RR e os metabólitos do isolado TM1 inibem a germinação da cultivar FUNDACEP 57RR.

O controle biológico pode representar uma alternativa mais econômica ao uso de alguns agroquímicos, por ser atóxico ao homem, e abundante na natureza. Sendo necessários estudos buscando outras metodologias para avaliar-se a ação de metabólitos secundários de *Trichoderma* na germinação e controle de fitopatógenos veiculados as sementes de soja.

6 REFERÊNCIAS

- BAKER, R. **Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity**. Oxford: Trends of Biotechnology. vol. 7, p. 34-38, Feb. 1989.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241p.
- BARRETOS, C.A. **Os impactos socioambientais do cultivo de soja no Brasil**. Disponível em: <http://www.anppas.org.br/encontro_anual/encontro2/GT/GT05/clarissa_barreto.pdf> Acesso em 19 de Nov. 2011.
- BERJAK, P. **Stored seeds: the problems caused by microorganism (with particular reference to the fungi)**. In: NASSER, L.C.; WETZEL, M.M.V.S. & FERNANDES, J.M. Seed pathology. International Advanced Course, Passo Fundo: ABRATES. 1987a. pt.1, p.38-50
- BRACCINI, A.L.; SÁ MOTTA, I.; SCAPIM, C.A.; BRACCINI, M.C.L.; ÁVILA, M.R.; SCHUAB, S.R.P. **Semeadura da soja no período de safrinha: potencial fisiológico e sanidade das sementes**. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.25, n.1, p.76-86, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- 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.
- CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Kubicek, C. P.; Harman, G. E. (Org.). ***Trichoderma* and Gliocladium**. London-UK: Taylor and Francis, 1998. v. 2, p. 153–171.
- CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D.T.; SÖDERSTRÖM, B. (Org.). **The Mycota IV: Environmental and microbial relationships**. Berlin-Germany: Springer-Verlag, 1997. p.165-184.
- CHRISTENSEN, C.M. **Microflora and seed deterioration**. In: ROBERTS, E.H. Viability of seeds. Syracuse: Univ. Press, 1972. p.59-93.
- EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região Central do Brasil 1996/97**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1996. 164p.
- EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004**. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/cultivares.html>> Acesso em 19 de novembro de 2011.

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, Luciana Z. et al. **Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa.** *Fitopatol. bras.* [online]. 2005, vol.30, n.2, pp. 127-133. ISSN 0100-4158. Acesso em 21 de nov. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582005000200004>>

ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomate e pepineiro.** (Tese Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2006.

FARIA, A.Y.K et al. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. ***Revista Brasileira de sementes*** . 2003, vol.25, n.1, pp. 121-127. ISSN 0101-3122. Acesso em 12 de nov <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222003000100019>>

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.

GOMES, D.P. et.al, **Efeito do vigor e do tratamento fungicida nos testes de germinação e de sanidade de sementes de soja.** Biosci. J., Uberlândia, v. 25, n. 6, p. 59-65, Nov./Dec. 2009

HENNING, A.A. et al. **Tratamento e inoculação de sementes** de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1994. 6p.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais.** Londrina: EMBRAPA- CNPSo, 2005. 52p.

HENNING, A.A. **Testes de sanidade de sementes de soja.** In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. Patologia de sementes. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap. 21, p.441-454.

ITO, M.F.; TANAKA, M. A. de S. **Soja: principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides.** Campinas: Fundação Cargill, 1993. 234p.

JUNGES, E. et al. Germinação e vigor de sementes de arroz semeadas em substrato tratado com o bioprotetor *Trichoderma* spp. em formulação líquida ou pó. ***Revista Agroecologia de Brasileira***, v.1, n.1, 2007.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO A. Diagnose. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia.** Princípios gerais de controle. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, 34,p. 692-709.

MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.4, n.2, p.33-35, 1994.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, RS, v. 4, p. 261-295, 1996.

MELO, I.S. **Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas.** In: BETTIOL,W. (org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna : EMBRAPA-CNPDA, 1991. Cap. 9. 388p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos,15). Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. V.1. Cap. 1. 262p.

MERTZ, L.M. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.13-18, jan-fev, 2009.

MESQUITA, A.L **Interferência de *Bipolaris oryzae* na germinação e desenvolvimento de plântulas de arroz e o controle biológico por *Trichoderma* spp.** Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Agronomia, Universidade Federal do Pampa, Itaqui-RS, 2011.

OUSLEY, M.A.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. *Microbial Ecology*, v.26, p.277-285, 1993. In: ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro.** 2006. 153 f. Tese (Doutorado) – UFSM, Santa Maria – RS, 2006.

PATRICIO F.R.; BORIN, R.B.R.G. & ORTOLANI, D.B. **Patógenos associados a sementes que reduzem a germinação e vigor.** In: MENTEN, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. cap. 3, p.137-160.

RIBEIRO, T.D. **O fungo *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos: dificuldades e perspectivas.** Monografia de pós-graduação Biologia Celular e Molecular- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2009.

USDA, **Departamento de Agricultura dos Estados Unidos** – USDA: <www.usda.gov> Acesso em 12 de novembro de 2011.

ZORATO M.F. et al. Efeitos da assepsia superficial com diferentes agentes químicos na incidência de microrganismos em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 23, nº 1, p.159-166, 2001.