

Efeito de espécies de *Trichoderma* no controle de fungos endofíticos em sementes de Mamona

Tereza Cristina de ASSIS¹, Maria MENEZES²

RESUMO: Sementes de quatro cultivares de mamona (Sipeal-28, Sipeal 06, Sipeal sm-2 e Amarela de Irecê-1) foram avaliadas quanto a presença de fungos endofíticos e a possibilidade de controle através do emprego dos isolados de *Trichoderma*: *T. viride* (TR2, TR3, TR4), *T. harzianum* (T.25), *T. polysporum* (T.11), *T. Koningii* (T.15). Em todas as cultivares estudadas, o gênero *Fusarium* foi detectado em alta percentage, como Amarela de Irecê-1 (78,57%), Sipeal sm-2 (55,07), Sipeal-06 (10,96%) e Sipeal-28 (6,77%). Dentro do gênero, foram encontradas quatro espécies: *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* e *F. moniliforme*. Estas espécies mostraram-se patogênicas quando inoculadas em plantas jovens de mamona, cultivar Sipeal-06. O tratamento das sementes com as espécies de *Trichoderma* spp. controlou os fungos endofíticos, mas em alguns casos, a germinação foi reduzida, principalmente, quando *T. koningii* foi aplicado. Entretanto, o isolado *T. viride* (TR4) não somente inibiu o crescimento dos fungos endofíticos de sementes de mamona, como também induziu uma melhor germinação, em relação aos demais isolados do antagonista.

Palavras-chave: Contrle biológico, semente de mamona, fungo endofítico

INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus comunis* L.) é uma planta oleaginosa da família Euforbiaceae, muito comum em regiões tropicais, onde recebe as denominações: caturra ou carrapateira (Augusto e Barreira, 1992). O óleo extraído de suas sementes é usado na medicina como purgante e, também, na aviação como anticongelante de combustíveis das aeronaves, revestimento de poltronas e paredes de aviões, lubrificantes, resinas, cosméticos, além de outras utilidades (Távora, 1992).

Ao lado da importância econômica, as sementes de mamona podem transportar microrganismos, mais frequentemente, os fungos, tanto externamente como internamente, e dentre estes, alguns patógenos causadores de tombamento de plântulas, podridão de raízes, manchas foliares, queima de inflorescência, além de reduzirem o "stand" de germinação. Além da transmissão de doenças, as sementes podem disseminar esses patógenos, eficientemente, de uma área para outra, onde antes não ocorriam.

Vários fungos já foram citados em sementes de mamona, destacando-se algumas espécies de *Fusarium*, *Alternaria* (*A. ricini*), *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Botrytis cinerea* (Peixoto, 1992), como importantes patógenos, e *Aspergillus*, *Penicillium* como fungos de armazenamento (Richardson, 1979), prejudicando a germinação. Com relação a *Fusarium*, *F. oxysporum* f. sp. *ricini*, é muito prejudicial a cultura por causar murcha da

planta, seguida de morte, conforme a suscetibilidade da cultivar de mamona.

O tratamento das sementes constitui uma medida da maior importância, porque possibilita a obtenção de um stand de germinação mais uniforme e, conseqüentemente, uma produção mais abundante. Dentre as medidas de controle utilizadas para o tratamento de sementes de diferentes espécies de plantas agrícolas, o biológico tem despertado a atenção de vários pesquisadores (Wright, 1956; Harman, Chet e Baker, 1980; Elad e Chet, 1982; Marshal, 1982; Lifshitz, Windham e Baker, 1980; Sivan e Chet, 1986; Sivan. Ucko e Chet, 1987; Sivan e Chet, 1989; Mukhopadhyay, Shrestha e Mukherjee, 1992, além de outros), envolvendo diferentes patógenos.

Com o objetivo de conhecer a eficiência de espécies de *Trichoderma* no controle de fungos endofíticos de sementes de mamona, foi desenvolvido o presente trabalho, cujos resultados servem de base para futuros programas de biocontrole de patógenos, através do tratamento das sementes com esses antagonistas.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungos endofíticos de sementes de mamona

Sementes de quatro cultivares de mamona (Sipeal-28, Sipeal-06, Sipeal sm-2 e Amarela de Irecê) foram analisadas quanto a presença de fungos localizados internamente. Amostras de 210 por cultivar, previamente

¹ Bolsista do PIBIC

² Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE e Pesquisador 1A - CNPq

tratadas com hipoclorito de sódio a 1,5%, durante cinco minutos, foram plaqueadas em caixas gerbox sobre papel de filtro umedecido com água esterilizada, sendo incubadas em condições normais do laboratório, por um período de oito dias, a temperatura de 28°C, aproximadamente. Após este período, procedeu-se a avaliação através da contagem das sementes germinadas e não germinadas, observando-se a presença de estruturas fúngicas sobre as mesmas. O exame foi efetuado com auxílio de um lupa estereoscópica, preparando-se lâminas para identificação dos fungos ao microscópio ótico. Em seguida foi determinado o total de colônias fúngicas por cultivar, estabelecendo-se a frequência percentual de cada espécie detectada nas sementes das cultivares estudadas. Também foi determinada a percentagem de germinação, bem como selecionada a cultivar mais infectada, para os estudos subsequentes.

Teste de patogenicidade das espécies de *Fusarium* detectadas

Para este teste, as espécies de *Fusarium* obtidas de sementes de mamona, foram cultivadas em meio de Armstrong (Armstrong, 1978), com agitação manual, diária, durante cinco dias, em condições de luz alternada com escuro, a temperatura de 25°C, aproximadamente. As culturas de *Fusarium* foram homogeneizadas, uma por uma, em liquidificador e, após filtradas em gaze dupla para obtenção da suspensão de conídios. A concentração de conídios da suspensão foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada para 1×10^6 conídios/ml.

Plantas da cultivar Sipeal-06, oriundas de sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1,5 %, na fase de emissão das primeiras folhas verdadeiras, foram inoculadas, através do método de ferimentos em raízes e, em seguida, vertendo-se o inóculo em torno de cada planta.

Foram utilizados quatro tratamentos, representados pelas espécies de *Fusarium*, com três repetições, obedecendo uma distribuição inteiramente casualizada. Plantas testemunhas (não inoculadas) foram deixadas para termo de comparação.

A avaliação foi efetuada aos 30 dias após a inoculação, observando-se a presença de sintomas externos e internos. No primeiro caso, os sintomas são caracterizados pela presença de amarelecimento, murcha e desfolhamento, enquanto que no segundo, os sintomas são caracterizados pelo escurecimento dos vasos do xilema.

Tratamento de sementes de mamona com isolados de *Trichoderma*

Amostras de sementes da cultivar Sipeal-06 foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1.5%, durante cinco minutos e, em seguida, passadas em água destilada esterilizada, para remoção do excesso de desinfetante. Após este processo, as sementes foram tratadas com seis isolados de *Trichoderma*: *T. viride* Pers.:Fries (TR2, TR3, TR4), *T. harzianum* Rifai (T25), *T. polysporum* (Link : Pers.) Rifai (T11) e *T. koningii* Oudem. (T15), pelo método de imersão numa suspensão de conídios, na concentração 1×10^6 conídios/ml, durante cinco minutos. Tanto as sementes tratadas com *Trichoderma*, como as não tratadas (testemunhas), foram plaqueadas em caixas gerbox, sobre papel de filtro umedecido, colocando-se 15 sementes por recipiente. A incubação ocorreu em condições normais do laboratório, a temperatura de 28°C, aproximadamente, durante o período de oito dias. Após este período, foi efetuada a avaliação do experimento, observando-se o efeito do tratamento na inibição ou redução de colônias fúngicas e, também, na germinação, e determinando-se a percentagem de sementes germinadas em relação a cada isolado de *Trichoderma* empregado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fungos endofíticos de sementes de mamona

Em geral, as cultivares de mamona estudadas, apresentaram vários fungos endofíticos em suas sementes, variando o número total de colônias, independente de gêneros e/ou espécies, de acordo com a cultivar envolvida.

Considerando-se o total de fungos por cultivar, observa-se que Amarela de Irecê-1, aparentemente apresentou uma melhor condição de sanidade em relação as demais. Entretanto, a análise da frequência de espécies fúngicas, conforme mostrada na Tabela 1, revelou alta percentagem de espécies do gênero *Fusarium* (78,5%), representado pelas espécies: *F. oxysporum* Schlecht, *F. moniliforme* Sheldon, *F. equiseti* (Corda) Sacc. e *F. semitectum* Berk., além de *Chaetomium globosum* Kunz (14,3%) e *Rhizopus stolonifer* (Ehreb.:Fries) Vuill (7,1%).

Qualitativamente, as cultivares Sipeal-06 e Sipeal-28 apresentaram maior diversidade fúngica, quando comparadas com Sipeal sm-2 e Amarela de Irecê-1 já citada, porém quantitativamente, Sipeal sm-2 foi a que mostrou maior percentual de colônias de fungos endofíticos.

Em geral, não foi observada uma relação direta entre a frequência de fungos por cultivar e a percentagem de germinação das sementes. De acordo com a (Figura 1), Sipeal-06 mostrou maior percentagem de germinação em relação as demais. Fazendo-se uma análise dos dados referentes a frequência de fungos endofíticos e a germinação das sementes de mamona, nas diferentes cultivares, observa-se que apesar da diversidade de organismos encontrados na Sipeal-06, não pareceu haver grande influência na germinação nas condições estudadas. É possível que a presença de *T. viride* (17,1%) dectada nas sementes desta cultivar, tenha contribuído para estimular a germinação, como também, para reduzir o efeito dos outros fungos, inclusive *Fusarium* spp.. Neste sentido, há relatos na literatura (Windham, Elad e Baker, 1986) sobre o efeito benéfico de *Trichoderma* spp. na indução da germinação e crescimento de plantas oriundas de sementes tratadas com espécies deste antagonista.

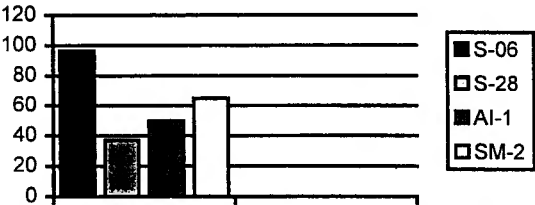


FIGURA 1- Germinação de sementes de mamona Sipeal-06 (S-06), Sipeal-28 (S-28), Sipeal SM-2 (SM-2) e Amarela de Irecê 1 (AI-1).

A cultivar Amarela de Irecê-1, embora no total de colônias tenha apresentado menor percentual, em relação as demais cultivares de mamona, com predominância das espécies de *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* e *F. moniliforme*, mostraram no entanto, uma percentagem de germinação relativamente baixa. Comportamento intermediário, quanto a germinação, foi observado para Sipeal-28 e Sipeal sm-2, cujas sementes apresentaram um percentual elevado de colônias, sendo as espécies mais diversificadas na primeira do que na segunda. Nesta, predominaram as espécies de *Fusarium* (55%), *Aspergillus niger* Tiegh (44,9%) e *Sclerotium rolsii* Sacc. (1,5%). Sabe-se que *A. niger* é um fungo de armazenamento (Neergaard, 1979) com capacidade para reduzir a germinação, em condições de temperatura e umidade altamente favoráveis, enquanto *S. rolsii* é conhecido como um

patógeno necrotrófico, sem especificidade hospedeira, podendo sobreviver na semente na forma de micélio dormente. Quanto a *Fusarium* spp., muitas espécies dentre elas *F. oxysporum*, têm potencial patogênico para uma grande gama de hospedeiros, onde recebem denominações subespecíficas de acordo com as cultivares com a planta hospedeira (Snyder e Hansen, 1940).

Teste de patogenicidade das espécies de *Fusarium* detectadas

As espécies *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* e *F. moniliforme* mostraram-se patogênicas quando inoculadas em plantas jovens de mamona, cultivar Sipeal-06, as quais exibiram sintomas externos e internos, variando a intensidade em função da espécie envolvida. *F. oxysporum*, provavelmente *F. oxysporum* f. sp. *ricini*, já é conhecido e considerado como um dos patógenos importantes da mamona (Kimati, 1980). Entretanto, com relação as demais espécies citadas, não há relatos sobre sua patogenicidade em plantas de mamona, embora sejam patógenos de outras culturas, dentre elas, o feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* (*F. equiseti*, *F. semitectum*) e o milho, *Zea mays* (*F. moniliforme*). Portanto, torna-se interessante a realização de outros estudos envolvendo essas espécies e diferentes cultivares de mamona para observação da reação de resistência ou suscetibilidade e comprovação da sua importância como patógenos dessa Euforbiaceae.

Tratamento de sementes de mamona com *Trichoderma*

De um modo geral, foi observada uma ação inibidora revelada pela ausência de fungos endofíticos nas sementes tratadas com os antagonistas (tabela 1).

Fungos	Sipeal -06	Sipeal -28	Sipeal SM-2	Amarela de Irecê-1
<i>T. viride</i>	17,18	3,38	0	0
<i>Fusarium</i> spp.	10,93	6,77	55,07	78,57
<i>Penicillium</i> sp.	3,12	1,69	0	0
<i>M. zamiae</i>	6,25	0	0	0
<i>C. globosum</i>	9,37	0	0	14,28
<i>R. stolonifer</i>	0	20,33	0	7,14
<i>A. niger</i>	53,12	45,76	44,93	0
<i>S. rolsii</i>	0	0	1,45	0
% colônias por cultivar	31,06	28,64	33,49	6,79

TABELA 1 - Frequência percentual das espécies fúngicas endofíticas de sementes de mamona detectadas pelo método do papel de filtro, aos oito dias de incubação.

As espécies de *Trichoderma* utilizadas, mostraram-se eficientes no controle, porém foi constatada certa tendência para redução da germinação, principalmente em relação a *T. koningii* (T15), quando comparado aos demais antagonistas, embora *T. viride* (TR4) tenha proporcionado um melhor resultado de germinação das sementes. É possível que se empregando uma concentração de conídios mais diluída e menor tempo de exposição das sementes de mamona à suspensão aquosa de *Trichoderma*, os resultados sejam superiores aos obtidos na concentração de 1×10^6 conídios/ml. Pessoa (1986) estudou o efeito de *Trichoderma* no tratamento de sementes de feijão, visando o controle de *Macrophomina phaseolina*, e observou que todas as espécies do antagonista reduziram o número de colônias e beneficiaram a germinação das sementes. Do mesmo modo, Andrade (1990) constatou redução de colônias fúngicas em sementes de milho tratadas com *Trichoderma* spp.

A evidência de sucesso no tratamento biológico de sementes é ampla. Segundo Mukhopadhyay, Shrestha e Mukherjee (1992), sementes de rabanete tratadas com *Trichoderma* podem ser armazenadas a temperatura ambiente (20 a 25°C) por 2 a 14 meses, sem perda da viabilidade do antagonista. Esta perda de viabilidade, conforme Harman, Chet e Baker (1980) depende da espécie ou isolado de *Trichoderma*.

ABSTRACT

Seeds of castor bean (Sipeal-28, Sipeal-06, Sipeal sm-2 e Amarela de Irecê-1 cultivars) were evaluated in relation to presence of endophytic fungi and possibility of control by *Trichoderma* isolates: *T. viride* (TR2, TR3, TR4), *T. harzianum* (T25), *T. polysporum* (T11), and *T. koningii* (T.15). Among cultivars studied, Sipeal-06 showed qualitatively a diversity of fungal species, but Sipeal sm-2 showed quantitatively more fungal colonies than the others. In all cultivars studied, the *Fusarium* genus was detected in high percentage, such as, Amarela de Irecê-1 (78,57%), Sipeal sm-2 (55,07%), Sipeal-06 (10,93%) e Sipeal-28 (6,77%). Included in the genus were found four species: *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* and *F. moniliforme*. These species showed pathogenicity when inoculated on castor bean seedlings of Sipeal-06 cultivar. The seed treatment with *Trichoderma* spp. controlled endophytic fungi, but in some cases, the germination was reduced, principally when *T. koningii* was applied. Nevertheless, the *T. viride* (TR4) isolate not only inhibited growth of

endophytic seedborn, as also induced a better seed germination in relation to others antagonistic isolates.

Key-words: Biological Control, Castor Bean seed, Endophytic Fungi

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALGUSTO, A. ; BARREIRA, S. A. A química fina da mamona. *Globo Ciência*, São Paulo, v. 2, n. 13, p. 29-31, agosto. 1992.
- 2 ARMSTRONG, J. K. A new race (race 6) of the cotton-wilt *Fusarium* from Brazil. *Plant Disease Reporter*, Beltsville, v. 62, n. 5, p. 421-423, 1978.
- 3 ANDRADE, V. M. R. Efeito do tratamento químico e biológico sobre a população fúngica e germinação de sementes de sorgo, *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Recife, 1990. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- 4 ELAD, Y.; KALFON, J.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton by seed seed coating with *Trichoderma* spp. spores. *Plant Soil*, Netherlands, v. 66, p. 279-281, 1982.
- 5 HARMAN, G. E.; CHET, I. ; BAKER, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 70, n.12, p. 1167-1172, 1980.
- 6 HEMERLY, F. X. Mamona: comportamento e tendências no Brasil. Brasília: EMBRAPA, 1981.
- 7 KIMATI, H. Doenças da Mamoneira. In: Manual de Fitopatologia. S. Paulo: Agronômica Ceres, 1980. Cap. 24, p.347-351.
- 8 LIFSHITZ, R.; WINDHAN, M. T.; BAKER, R. Mechanisms of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, St. Paul, v. 76, n.7, p. 720-725, 1986.
- 9 MCCLELLAN, W. D. A seedling blight of castor bean, *Ricinus communis*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 34, n. 2, p. 223-229, 1944.
- 10 MARSHAL, D. S. Effect of *Trichoderma harzianum* seed treatment and *Rhizoctonia solani* inoculum concentration on damping-off of snap. bean in acidic soils. *Plant Disease*, St. Paul, v. 66, n. 9, p. 788-789, 1982.
- 11 MUKHOPADHYAY, A. N.; SHRESTHA, S. M. ; MUKHERJEE, P.K. Biological seed treatment for control of soil-borne plant pathogens. *FAO Plant Prot.Bull.* v. 40, n. 12, p. 21-30, 1992.

12

NEERGAARD, P. Seed Pathology. London, MacMillan Press LTD, 1979.

13

PEIXOTO, C. N. Avaliação da micoflora associada a sementes de mamona *Ricinus communis* L. e efeito de *Trichoderma* spp. e substâncias tóxicas sobre *Alternaria ricini* (Yoshii) Hansford. Recife, 1992. p.123. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

14

PESSOA, M. N. G. Detecção e localização de *Macrophomina phaseolina* (Thass) Goid. em sementes de feijão, *Phaseolus vulgaris* L., controle biológico e químico. Recife, 1986. p. 176. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

15

SIVAN, A.; CHET, I. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. J. **Phytopathology**, Berlin, Hamburgo, v. 116, p. 39-47, 1986.

16

SIVAN, A.; UCKO, O.; CHET, I. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 7, p. 587-592, 1987.

17

SIVAN, A. ; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 2, p. 198-203. 1989.

18

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium* . **Amer. Jour. Bot.**, Columbus, v. 27, p. 64-67. 1940.

19

STEVENSON, E. C. *Alternaria ricini* (Yoshii) Hansford the causal of a serious disease of the castor bean plant (*Ricinus communis* L.) in the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 35, n. 4, p. 249-256. 1945.

20

TÁVORA, F. J. A. A cultura da mamona. Fortaleza : EMATER-CE, 1992. 111 p.

21

WINDHAN, M. T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 5, p. 518-521. 1986.

22

WRIGHT, J. M. Biological control of soil-borne *Pythium* infection by seed inoculation. **Plant Soil**, Netherlands, v. 9, p. 132-140. 1956.