

Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia

Fusarium oxysporum agente da podridão radicular em alfafa, transmitido por semente

Em alfafa (*Medicago sativa* L.), o fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht., transmitido por sementes, tem sido relatado como um dos principais agentes da podridão radicular, doença que reduz significativamente a produtividade dessa cultura. Os isolados de *F. oxysporum* que causam murcha, obtidos de sementes, normalmente, apresentam virulência maior do que os isolados obtidos de hastes de plantas doentes.

Controle de fungos em sementes

O controle de fungos transmitidos por sementes é necessário principalmente para se evitar a transmissão de doenças a longas distâncias e também para melhorar a qualidade do material utilizado para propagação na mesma região. O emprego de agroquímicos tem sido a forma mais comum utilizada no controle de doenças, porém verificam-se algumas desvantagens, principalmente por contaminar o meio ambiente com resíduos tóxicos não biodegradáveis e pela resistência desenvolvida pelos microrganismos a esses compostos.

A aplicação de agentes de controle biológico em sementes, como isolados de *Trichoderma* Pers., uso de formulações de bactérias e o controle integrado através da aplicação de agentes microbianos e fungicidas reduzem a incidência de doenças causadas por *F. oxysporum*. A aplicação de óleo essencial de algumas plantas também inibe o crescimento de *F. oxysporum* em sementes.

A técnica de controle de fungos transmitidos por sementes utilizando calor seco ou úmido, tem apresentado resultados promissores, sendo considerado viável nos procedimentos fitossanitários. Por meio desta terapia são controlados e/ou erradicados diversos patógenos de sementes de beterraba, de *Brassica juncea* Coss., de cenoura entre diversos outros produtos agrícolas.

Erradicação de *F. oxysporum* de sementes de alfafa, utilizando termo ou quimioterapia

Produção de sementes de alfafa contaminadas com *F. oxysporum*

A partir de sementes de alfafa infectadas, foi obtido um isolado de *F. oxysporum*, sendo o mesmo cultivado em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar), sob luz fluorescente contínua, a temperatura de 28 °C, por 10 dias. Decorrido esse período, o fungo foi inoculado em sementes de alfafa (60 g) foram colocadas em um bequer de 250 ml e imersas em suspensão de 10⁸ conídios/ml, por 15 minutos. Durante este tempo, as sementes foram agitadas com o auxílio de um bastão de vidro, de 3 em 3 minutos, para homogeneizar o inóculo. Após este procedimento as sementes foram filtradas em gaze e colocadas sobre duas folhas de papel de filtro, dentro de dissecador acoplado a bomba a vácuo (200 mmHg), que permaneceu em funcionamento por três horas. As sementes foram mantidas no dissecador até serem submetidas aos tratamentos.

Tratamento térmico a seco das sementes inoculadas com *F. oxysporum*

As sementes de alfafa foram colocadas, previamente, em câmara de secagem com 16 % UR (Umidade Relativa) e temperatura de 22 °C, durante 15 dias, sendo depois submetidas a

um pré-tratamento térmico a 60 °C por 3 e 6 horas, passando para 90 °C, sendo, nesta temperatura definidos dois tratamentos com durações de três e seis horas.

Os tratamentos térmicos foram realizados em estufa com fluxo de ar contínuo, marca Fanem, modelo 330, utilizando-se de uma câmara para cada temperatura. Após os tratamentos, as sementes foram submetidas a testes para avaliar o efeito sobre o controle de *F. oxysporum* e na germinação das sementes.

Detecção de *F. oxysporum* em sementes

As sementes submetidas aos tratamentos foram analisadas quanto a incidência de *F. oxysporum* pelo método de plaqueamento em papel de filtro ("Blotter Test") (ISTA, 1976), como segue: as sementes foram colocadas em caixas plásticas, tipo "gerbox", que medem 10x10x4 cm (comprimento x largura x altura), contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada estéril, sendo colocadas 50 sementes por "gerbox". As sementes foram incubadas por 10 dias, a 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas de luz NUV (Near Ultra Violet) e 12 horas escuro. Os fungos foram identificados pelas características morfológicas observadas aos microscópios estereoscópio e óptico.

Determinação do poder germinativo das sementes

Foi realizado o teste de germinação conforme prescrito nas Regras de Análises de Sementes, exceto na quantidade de sementes que foram utilizadas 200 ao invés de 400. Em cada "gerbox" foram colocadas 50 sementes que após distribuição foram incubadas em câmara com 100 % de UR, temperatura a 28 °C, sob luz fluorescente contínua. A germinação foi avaliada aos seis e onze dias após o início do teste.

Tratamento térmico úmido das sementes inoculadas com *F. oxysporum*

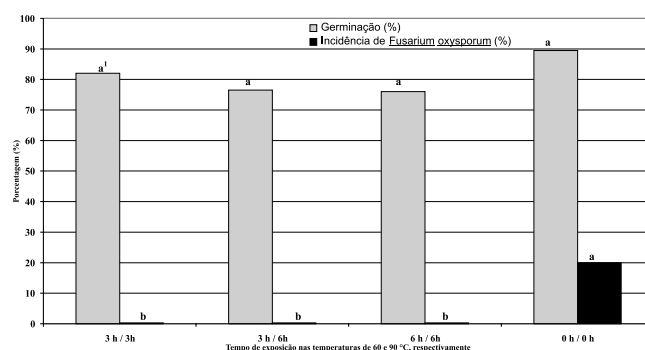
Sementes de alfafa inoculadas com *F. oxysporum*, acondicionadas em sacos de tecido de "organdi", foram imersas em banho-maria com agitador, a temperatura de 40 °C, para o pré-tratamento por períodos 10, 20 e 30 minutos, e imediatamente transferidas para outro banho-maria regulado para 50 ou 60 °C, com agitador, para o tratamento, por períodos de 10, 20 e 30 minutos, e em seguida foram resfriadas em água a ± 22 °C. Sementes sem tratamento foram mantidas como testemunha. Após os tratamentos as sementes foram avaliadas quanto a incidência de *F. oxysporum* e germinação, conforme metodologia descrita anteriormente.

Tratamento químico em sementes de alfafa inoculadas com *F. oxysporum*

Para efeito de comparação, as sementes de alfafa inoculadas com *F. oxysporum* foram submetidas ao método convencional de tratamento químico com os produtos benomyl, thiabendazole, iprodione e thiram, nas dosagens recomendadas pelos fabricantes e nas dosagens recomendadas triplicadas. A avaliação dos tratamentos realizou-se por meio do teste de sanidade e germinação descritas anteriormente.

Erradicação de *F. oxysporum* em sementes de alfafa

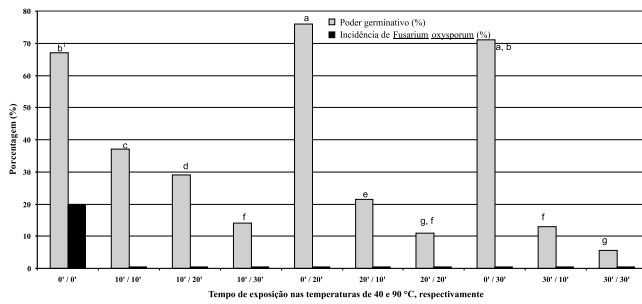
Não foi observado o desenvolvimento de *F. oxysporum* em sementes de alfafa que foram submetidas ao tratamento térmico seco nas temperaturas de 60 °C (pré-tratamento) e 90 °C (tratamento), independente do tempo de exposição. Estes tratamentos também não afetaram significativamente a germinação das sementes (Fig.1).



¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si em nível de 5 % de significância pelo teste de F.

Fig. 1. Efeito do tratamento térmico seco (60 e 90 °C) no poder germinativo e no controle de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa.

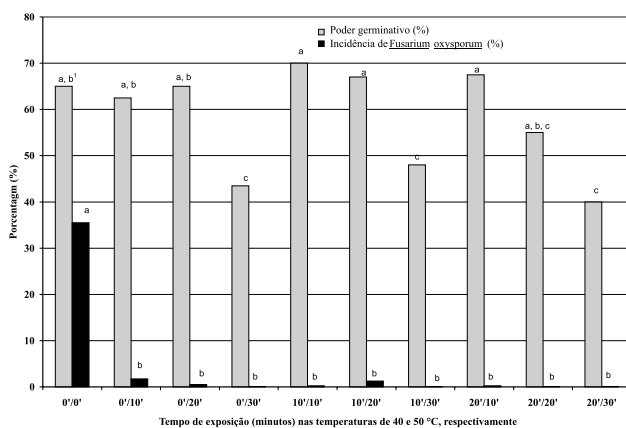
O tratamento térmico úmido, com pré-tratamento a 40 °C por 10, 20 ou 30 minutos, seguido do tratamento a 60 °C pelo mesmo período de exposição, erradicou *F. oxysporum* das sementes de alfafa, porém reduziu significativamente a germinação das sementes. A aplicação deste tratamento apenas a 60 °C por 20 e 30 minutos reduziu significativamente a incidência de *F. oxysporum* sem prejudicar a germinação das sementes, sendo que no período de 20 minutos de exposição, a germinação foi maior do que na testemunha (Fig. 2). Observa-se que o tratamento térmico úmido foi empregado para diferentes espécies de *Fusarium* e pode ser considerado uma opção para o seu controle.



¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si em nível de 5 % de significância pelo teste de F.

Fig. 2. Efeito do tratamento térmico úmido (40 e 60 °C) no poder germinativo e no controle de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa.

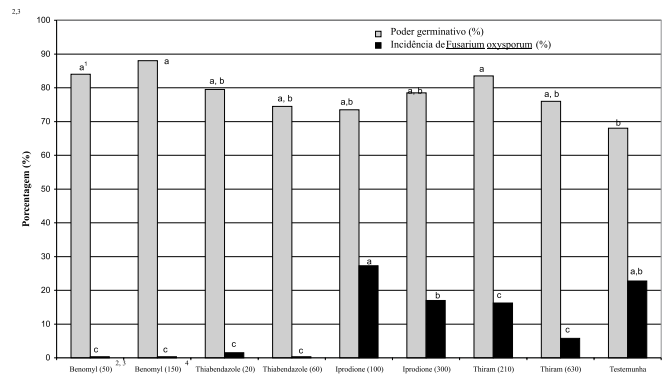
O tratamento térmico úmido a 40 °C (pré-tratamento) por 20 minutos, seguido de tratamento a 50 °C pelo mesmo período de exposição, erradicou *F. oxysporum* das sementes de alfafa sem afetar significativamente a germinação das sementes. Essas mesmas temperaturas por períodos maiores foram eficientes na erradicação do fungo, entretanto afetaram significativamente a germinação das sementes de alfafa (Fig. 3). Desta forma podemos afirmar que, o sucesso do tratamento térmico depende do tipo de calor, seco ou úmido, a uniformidade da aplicação do calor, do período de exposição e da temperatura empregada.



¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si em nível de 5 % de significância pelo teste de F.

Fig. 3. Efeito do tratamento térmico úmido (40 e 50 °C) no poder germinativo e no controle de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa.

Os fungicidas testados, benomyl, thiabendazole, iprodione e thiram, aumentaram a germinação das sementes de alfafa contaminadas com *F. oxysporum*, sendo que o produto benomyl aplicado nas dosagens de 50 g e 150 g de i.a. (ingrediente ativo) por Kg de sementes e thiram aplicado na dosagem triplicada (210 g de i.a. por kg de sementes), aumentaram significativamente a germinação das sementes (Fig. 4).



¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si em nível de 5 % de significância pelo teste de F.

²g de i.a. (ingrediente ativo) do produto recomendado 100 kg por Kg de sementes

³ Dosagem recomendada pelo fabricante.

⁴ 3 vezes a dosagem recomendada pelo fabricante.

Fig. 4. Efeito de produtos químicos no poder germinativo e sanidade de sementes de alfafa contaminadas com *Fusarium oxysporum*.

Benomyl, nas duas dosagens testadas (50 e 150 g de i.a. por kg de sementes) e thiabendazole na dosagem triplicada (60 g de i.a. por kg de sementes) erradicaram o fungo *F. oxysporum* das sementes de alfafa (Fig. 4). Benomyl e thiabendazole foram descritos em literatura erradicando *F. oxysporum* em sementes de outras culturas. Embora estes fungicidas sejam eficientes no controle/erradicação de espécies de *F. oxysporum*, alguns isolados tem sido descritos em literatura apresentando resistência a thiabendazole e a benomyl, demonstrando a necessidade da utilização de formas alternativas para o controle deste fungo.

Thiabendazole, na dosagem recomendada pelo fabricante e thiram, nas duas dosagens testadas, controlaram significativamente o fungo (Fig. 4). Iprodione foi o único produto que não controlou significativamente *F. oxysporum* em sementes de alfafa nas duas dosagens testadas (100 e 300 g de i.a. por kg de sementes) (Fig. 4).

Conclusões

- O tratamento térmico úmido, 40 °C por 20 minutos, seguido de 50 °C por 20 minutos, erradicou o patógeno *F. oxysporum*, mas reduziu significativamente a germinação das sementes.

- O tratamento térmico seco a 60 °C por 3 horas, seguido de 90 °C por 3 ou 6 horas de exposição, erradicou *F. oxysporum* sem alterar significativamente a germinação das sementes.

- Benomyl foi o mais eficiente dos produtos químicos testados, erradicando *F. oxysporum* sem afetar a germinação das sementes de alfafa.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração de Murillo Lobo Junior, Alaíde Soares de Oliveira e de Maria de Fátima Batista pelo auxílio na realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

DHIRENDRA, M., CHATURVEDI, R.V., TRIPATHI, S.C. & MISHRA, D. The fungitoxic effect of the essential oil of the herb *Nardostachys jatamansi* DC. *Tropical Agriculture*, 72(1):48-52, 1995.

DE LEON, C. & GRUDLOYMA, U. Heat therapy of maize seed and its effect on viability. *Indian-Phytopathology* 47:1, 1994.

DONALD, D.G.M. & LUNDQUIST, J.E. Treatment of Eucalyptus seed to maximise germination. *South African Forestry Journal*, 149:9-15, 1988.

ERLEY, D.P., MYCOCK, D.J. & BERJAK, P. The elimination of *Fusarium moniliforme* (Sheldon) infection in maize caryopses by hot water treatments. *Seed Science and Technology*, 25(3):485-501, 1997.

FONSECA, J.N.L., MENDES, M.A.S., PINHEIRO, F.P. & VIDAL, A.S. Efeito da termo e quimioterapia em sementes de soja contaminadas com *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia brasileira* 19:297, 1994. (Resumo).

GARRIDO, L.A., OLIVEIRA, A.S., VIDAL, A.S., MENDES, M.A.S. & FONSECA, J.N.L. Sementes de *Glycine max* infectadas artificialmente com *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* e *Colletotrichum truncatum*. *Fitopatologia brasileira* 21:359, 1996 (Resumo).

KAUR, N.P. & MUKHOPADHYAY, A.N. Integrated control of "chickpea wilt complex" by *Trichoderma* and chemical methods in India. *Tropical Pest Management*, 38(4):372-375, 1992.

RAJU, U.J. & SIVAPRAKASAM, K. Influence of seed treatment with fungicides, bactericide, hot water and antagonists on the seedling vigour of cabbage. *Madras Agricultural Journal*, 76:26-30, 1989.

RANDHAWA, H.S. & AULAKH, K.S. Efficacy of hot water treatment to control seed-borne fungi of raya (*Brassica juncea* Com.). *Indian Journal of Plant Pathology*, 4(1):73-76, 1984.

REIS, A., OLIVEIRA, S.M.A. de, MENEZES, M., MARIANO, R. de L.R. & de OLIVEIRA, S.M.A. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, 21(1):16-20, 1995.

SANTOS, B.A., ZAMBOLIM, L., VENTURA, J.A. & VALE, F.X.R. Resistência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl. *Fitopatologia brasileira* 24:436-439, 1999.

VENKATASUBBAIAH, P., PRABHU, M.S.C., SHETTY, H.S. & SAFEEULLA, K.M. Effect of hot water and chemical seed treatment on seed mycoflora in koo-babul. *Bangladesh-Journal of Botany*, 13:121-129, 1984.

VIDHYASEKARAN, P. & MUTHAMILAN, M. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Disease* 79(8):782-786, 1995.

WINTER, W., BANZIGER, I., KREBS, H. & RUEGGER, A. Water treatments against damping-off diseases of cereals. *Agrarforschung*, 4:467-470, 1997.

Circular Técnica, 18

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 150 unidades

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Miraci de Arruda Câmara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Câmara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva