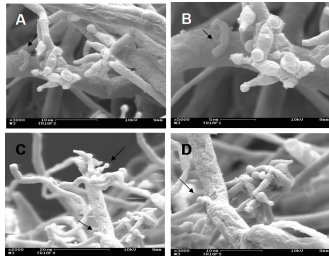


# Comunicado 178

## Técnico

ISSN 9192-0099  
Setembro, 2008  
Brasília, DF



### ISOLADOS DE *Trichoderma* sp. ANTAGÔNICOS A *Fusarium oxysporum*

Carvalho, D.D.C<sup>1</sup>  
Oliveira, T.A.S<sup>1</sup>  
Braúna, L.M<sup>2</sup>  
Mello, S.C.M<sup>3</sup>

O fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, causador da murcha-de-fusário, consiste em um dos patógenos de maior ocorrência no feijoeiro, causando danos expressivos à cultura e grandes prejuízos aos produtores (WANDER, 2005). Os agrotóxicos, a exemplo dos fungicidas, têm contribuído para ganhos na obtenção dos alimentos e das fibras necessárias à população mundial. Entretanto, eles estão relacionados ao aumento dos custos da produção, contaminação de alimentos e do meio ambiente (HOAGLAND, 1996; McFAYDEN, 1998) e à crescente resistência dos microrganismos fitopatogênicos aos produtos sintéticos (AMARAL e BARA, 2005).

Nesse contexto, existe uma crescente valorização dos produtos da natureza, considerados confiáveis e seguros. As grandes companhias, visando atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente, vêm

procurando novas moléculas e microrganismos detentores de atividade biológica e, com esse objetivo, examinando os elementos que constituem a biodiversidade (FERREIRA et al., 1998). Microrganismos antagônicos quando empregados como alternativa ao controle químico, podem proporcionar excelentes níveis de controle a médio e longo prazo (KIM et al., 2008). Em decorrência, existe uma considerável demanda por novas metodologias de controle de fungos fitopatogênicos a partir do emprego de microrganismos antagonistas (ETHUR et al., 2005; MELO et al., 2006). O objetivo deste trabalho foi testar o efeito antagonista *in vitro* de 10 isolados de *Trichoderma* sp. contra *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* e estudar interações *in vitro* entre o patógeno e o agente de biocontrole por microscopia eletrônica de varredura (MEV), visando a futuros trabalhos no biocontrole da doença.

<sup>1</sup> Eng. Agr., M.Sc., Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 70919-900, Brasília - DF.

<sup>2</sup> Biólogo, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70770-900, Brasília - DF.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70770-900, Brasília - DF. \*e-mail: smello@cenargen.embrapa.br

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolados de *Trichoderma* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Os isolados de *Trichoderma* sp. e *S. sclerotiorum* utilizados neste trabalho pertencem à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para os experimentos foram utilizados os isolados de *Trichoderma* sp. (CEN 287, CEN 288, CEN 289, CEN 290, CEN 293, CEN 295, CEN 298, CEN 299, CEN 301 e CEN 302) e *F. oxysporum* (C-03-01).

### Avaliação do antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. em cultura pareada.

A verificação do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* sp. contra o patógeno *S. sclerotiorum* foi realizada utilizando-se a metodologia adaptada de cultura pareada descrita por Dennis e Webster (1971), com a diferença de proporcionar o pré-estabelecimento do patógeno (crescimento sobre 1/3 da placa de Petri). Discos de ágar (5 mm de diâmetro) retirados de colônias de *F. oxysporum* com seis dias de cultivo, foram transferidos para placa de Petri contendo meio BDA solidificado e, após quatro dias, foi posicionando opostamente, em cada placa, um disco de cultura do antagonista (ÁVILA et al., 2005). Posteriormente, as placas foram mantidas em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações consistiram da

medição do diâmetro das colônias do patógeno cinco dias após repicagem dos isolados do antagonista. A classificação do antagonismo, de acordo com escala descrita por Bell et al. (1982), foi realizada a partir de observações aos 7 dias de cultivo pareado. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e, os valores médios obtidos relativos ao crescimento radial, utilizados para análise estatística empregando-se o teste de Scott e Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

### Verificação do hiperparasitismo de *Trichoderma* sp. sobre *F. oxysporum*.

Para estudo das interações entre o patógeno e o antagonista, discos de micélio (5 mm de diâmetro) da região de confronto entre os dois fungos foram retirados após 7 dias de cultivo pareado. Estes foram fixados em Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M a pH 7,2, contendo CaCl<sub>2</sub> 0,001 M) durante 48 horas. Após 3 lavagens com tampão cacodilato, os discos foram pós-fixados por 2 horas com tetróxido de ósmio 1% a pH 7,2. Subsequentemente, as amostras foram lavadas três vezes com água destilada, e desidratadas em gradiente crescente de álcool etílico (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%). As amostras foram secas ao ponto crítico com dióxido de carbono no secador Elmitech K 850. Logo após, as amostras foram montadas sobre stubs de alumínio e metalizados com ouro (20 nm) em evaporador de ouro Elmitech k 550 (ALVES, 2004). As amostras foram

observadas em microscópio eletrônico ZEISS DSM 962.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação *in vitro* do antagonismo de *Trichoderma* sp. em cultura pareada.

Dentre os 10 isolados de *Trichoderma* sp., CEN 289, CEN 288 e CEN 290 foram os que apresentaram maior antagonismo,

reduzindo o crescimento médio do patógeno a valores significativamente inferiores aos demais tratamentos (Tabela 1). Aos sete dias, os três isolados mencionados colonizaram pelo menos 66,66% da superfície do meio de cultura, inibindo fortemente o desenvolvimento de *F. oxysporum*. CEN 287 mostrou um alto grau de antagonismo, sobrepondo colônias de *F. oxysporum* e colonizando 66% da placa de Petri (valor 2 na escala de Bell).

**Tabela 1** – Crescimento de *Fusarium oxysporum* ao 5º dia de cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* sp. e classificação dos isolados quanto ao antagonismo, segundo escala de Bell et al. (1982)\* ao 7º dia de cultivo pareado.

| Isolado de <i>Trichoderma</i> | Crescimento das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> (cm) ao 5º dia** | <i>Trichoderma</i> sp. quanto ao antagonismo ao 7º dia*. |
|-------------------------------|--|--|
| CEN 289                       | 4,0 a  | 2  |
| CEN 288                       | 4,1 a  | 2  |
| CEN 290                       | 4,2 a  | 2  |
| CEN 287                       | 4,4 b  | 2  |
| CEN 301                       | 4,4 b  | 3  |
| CEN 293                       | 4,4 b  | 4  |
| CEN 298                       | 4,5 b  | 3  |
| CEN 302                       | 4,5 b  | 3  |
| CEN 299                       | 4,8 c  | 3  |
| CEN 295                       | 5,1 c  | 3  |
| Coeficiente de variação       | 4,66%  | -  |

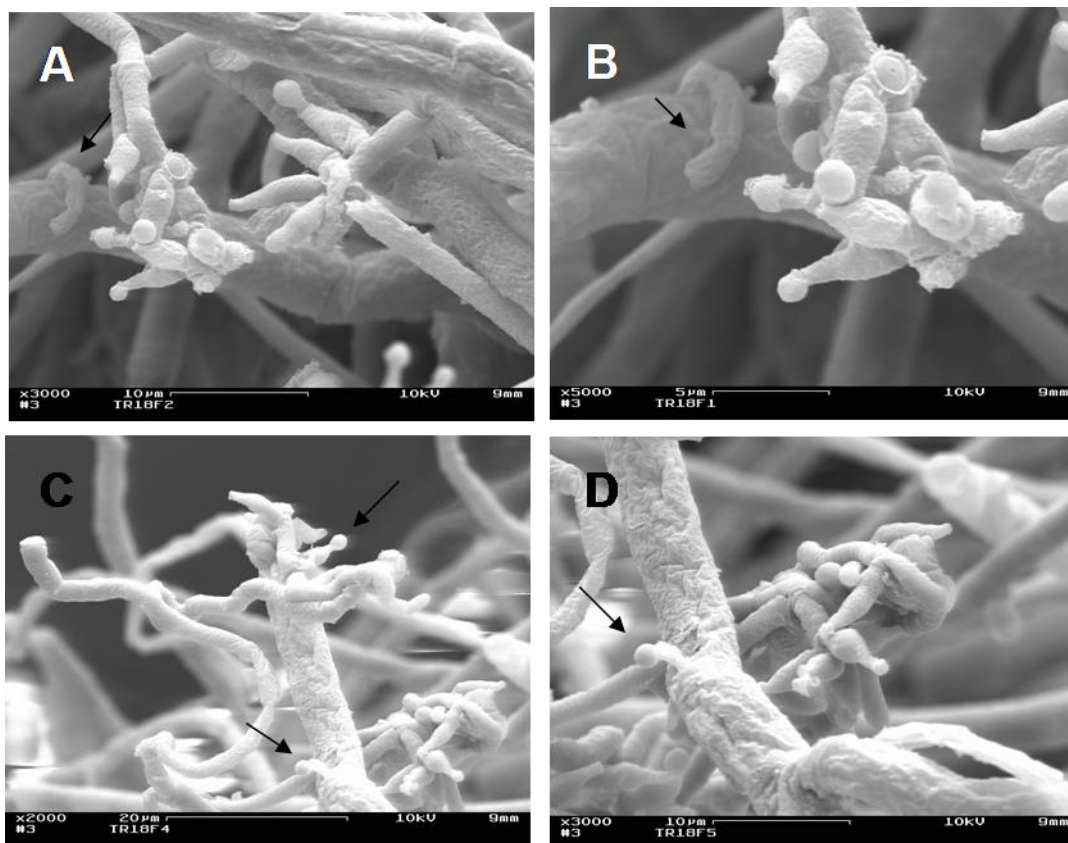
\*Classe 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Classe 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

\*\*Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

### Verificação do hiperparasitismo de *Trichoderma* sp. sobre *F. oxysporum*.

Imagens de MEV mostraram colonização do patógeno, o qual foi completamente enrolado e amarrado pelas

hifas do antagonista (Figuras 1A e 1B). Conídios do isolado de *Trichoderma* (CEN 287) foram observados sobre hifas de *F. oxysporum* (Figuras 1C e 1D). Os dois tipos de interações verificados podem ser considerados como hiperparasitismo (Agrios, 2005).



**Fig. 1** – Microscopia eletrônica de varredura mostrando interações entre *Trichoderma* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: **A)** seta mostrando um enrolamento do patógeno pelo antagonista; **B)** enrolamento do patógeno pelo antagonista em maior aumento; **C, D)** Conídios de *Trichoderma* sobre a hifa de *F. oxysporum*.

Os isolados de *Trichoderma* sp. CEN 289, CEN 288 e CEN 290 apresentaram antagonismo *in vitro* a *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Em decorrência, estudos futuros deverão ser realizados para avaliar a capacidade antagonista em condições de casa-de-vegetação e de campo.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005. p. 293-353.
- ALVES, E. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43 p.
- AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.
- ÁVILA, Z. R.; CARVALHO, S. S.; BRAÚNA, L. M.; GOMES, D. M. P. A.; MELLO, S. C. M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 30 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 117).
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn., v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, Cambridge, Inglaterra, v.57, p. 363-369, 1971.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. R.;

ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 127-133, 2005.

FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S.; SALLES, S. L. M.; QUEIRÓZ, S. R. R.; HELNY NETO, N. E.; CORAZZA, R.; FARIAS, R. C. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 131 p.

HOAGLAND, R. E. Chemical Interactions with Bioherbicides to Improve Efficiency. **Weed Technology**, Champaign, Ill., US, v. 10, p. 651-674, 1996.

KIM, Y. C.; JUNG, H.; KIM, K. Y.; PARK, S. K. An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda, NL, v. 120, p. 373-382, 2008.

McFAYDEN, R. E. C. Biological Control of Weeds. **Annual Review of Entomology**, Stanford, Conn., US, v. 43, p. 369-393, 1998.

MELO, I. S.; FAULL, J. L.; NASCIMENTO, R. S. Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, SP, v. 37, p. 417-419, 2006.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A. cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Washington, US, v. 30, n. 3, p. 502-512, 1974.

WANDER, A.E. Cultivo do feijão irrigado na região noroeste de Minas Gerais. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/index.htm>>. Acesso em: 01 out. 2007.

#### Comunicado Técnico, 178

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 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br> e-mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2008):

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



#### Comitê de Publicações

**Presidente:** Sergio Mauro Folle  
**Secretário-Executivo:** Maria da Graça Simões Pires Negrão

**Membros:** Arthur da Silva Mariante  
Maria da Graça S. P. Negrão  
Maria de Fátima Batista  
Maurício Machain Franco  
Regina Maria Dechechi Carneiro  
Sueli Correa Marques de Mello  
Vera Tavares de Campos Carneiro

#### Expediente

**Supervisor editorial:** Maria da Graça S. P. Negrão  
**Normalização Bibliográfica:** Maria Iara Pereira Machado  
**Editoração eletrônica:** Daniele Alves de Loiola