

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* spp. ANTAGÔNICOS A
Sclerotium rolfsii e *Sclerotinia sclerotiorum***

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 117

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* spp.
ANTAGÔNICOS A *Sclerotium rolfii* E *Sclerotinia
sclerotiorum***

**Zilá Ribeiro de Ávila
Sandra Silva Carvalho
Leonardo Minaré Braúna
Diogo M. P. Abreu Gomes
Marta César Ferreira Silva
Sueli Corrêa Marques de Mello**

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) 3348-4739 Fax:

(61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

S 464 Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. Antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* / Zilá Ribeiro de Ávila ... [et. al.]. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

30.p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 117)

1. Fungo. 2. *Trichoderma*. 3. *Sclerotium rolfsii*. 4. Podridão da haste. I. Carvalho, Sandra S. II. Braúna, Leonardo M. III. Gomes, Diogo M. p. A. IV. Silva, Marta C. F. V. Mello, Sueli C. M. de. VI. Série.

632.96 – CDD 21

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Obtenção e armazenamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	9
2.2. Avaliação da variabilidade dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao crescimento micelial e produção de esporos em meio BD e BDA.	10
2.3. Verificação da capacidade antagonista dos isolados <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , in vitro.	11
2.3.1. Antagonismo em cultura pareada.....	11
2.3.2. Antagonismo por metabólitos não voláteis	11
2.3.3. Antagonismo por metabólitos voláteis	12
2.4. Verificação do hiperparasitismo de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i>	12
2.5. Avaliação do efeito antagonista dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>S. rolfsii</i> em plantas de soja e feijão.....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1. Obtenção e caracterização morfológica dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	14
3.2. Avaliação da variabilidade dos isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao crescimento micelial e produção de conídios em meio BD e BDA.....	14
3.3. Verificação da capacidade antagonista dos isolados <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i> in vitro, em cultura pareada.....	17
3.3.1. Antagonismo em cultura pareada.....	17
3.3.2. Antagonismo por metabólitos não voláteis	20
3.3.3. Antagonismo por metabólitos voláteis	20
3.4. Verificação do micoparasitismo de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i>	21
3.5. Avaliação do efeito antagonista dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>S. rolfsii</i> em plantas de soja e feijão.....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* spp.
ANTAGÔNICOS A *Sclerotium rolfii* E *Sclerotinia
sclerotiorum***

**Zilá Ribeiro de Ávila
Sandra Silva Carvalho
Leonardo Minaré Braúna
Diogo M. P. Abreu Gomes
Marta César Ferreira Silva
Sueli Corrêa Marques de Mello**

RESUMO

Os fungos *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum* são patógenos altamente destrutivos, de várias culturas de importância econômica, dentre elas a soja e o feijão. Estudos envolvendo a utilização de espécies de *Trichoderma* spp. para o controle desses patógenos têm sido amplamente divulgado com resultados satisfatórios. Nesta pesquisa foram conduzidos experimentos com o objetivo de selecionar isolados de *Trichoderma* para reduzir os efeitos danosos destes patógenos. Foram realizados isolamentos, identificação, caracterização, quantificação, preservação e avaliações da capacidade antagonista em casa de vegetação e in vitro. Os resultados das avaliações in vitro sugerem que diversos mecanismos de ação podem estar envolvidos no controle dos dois patógenos. Testes de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram o hiperparasitismo exercido por alguns isolados do antagonista. Para outros isolados, inibição do crescimento dos patógenos foi verificado quando estes foram cultivados em presença de filtrados e/ou metabólitos difusíveis no meio de cultivo. Em casa de vegetação, observou-se excelente controle do *S. rolfii*, em solos contaminados com o patógeno e tratados com *Trichoderma* spp., antes do semeio com soja e feijão.

ABSTRACT

The fungi *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum* fungi are highly destructive pathogens for many cultures of economic importance, amongst them the soybeans and beans ones. Studies involving the use of *Trichoderma* species for controlling these pathogens with satisfactory results has been widely publicated. In the present research, experiments with the objective to select isolates of *Trichoderma* to reduce the harmful effect of those pathogens have been made. The experiments had been carried out through isolation, identification, quantification, preservation and evaluation of the antagonistic capacity in greenhouse and in vitro. Different inhibition mechanisms in vitro were suggested for the isolates. Some of them presented the potential in inhibiting the pathogens growth regarding the production of toxic metabolites as well as for parasitism. An excellent control of the *S. rolfsii* was observed in greenhouse for soybeans and beans plants.

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico de patógenos de plantas possui uma série de vantagens em relação aos pesticidas convencionais. Enquanto os fungicidas têm somente um efeito temporário e usualmente necessitam aplicações repetidas durante o período de crescimento da cultura, os agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer, colonizar e de se reproduzirem no ecossistema. Além disso, as estratégias de controle biológico são totalmente compatíveis com as práticas de agricultura auto - sustentável, que são necessárias para a conservação dos recursos naturais, promovendo menor impacto ao ambiente, evitando o rompimento do equilíbrio ecológico (SIVAN e CHET, 1992). Pela simplicidade e baixo custo, são também importantes no contexto da agricultura familiar, onde a escassez de recursos não permite a utilização da alta tecnologia, baseada em insumos caros. Por estas razões, o controle biológico tem se desenvolvido como uma estratégia viável e promissora para a redução de doenças em plantas, usado tanto individualmente como em combinação com outras medidas fitossanitárias (JACK et al., 1991). Os antagonistas de fungos fitopatogênicos mais estudados pertencem ao gênero *Trichoderma*, que exhibe considerável variabilidade entre as linhagens com relação à atividade de biocontrole, espectro de ação contra os hospedeiros, propriedades fisiológicas e bioquímicas, como também, adaptabilidade ecológica e ambiental. Além disso, os fungos desse gênero podem ser isolados dos habitats naturais dos patógenos, ou seja, de solos ou de plantas.

Sucesso no uso de *Trichoderma* como agente de biocontrole tem sido documentado, em diversos países, sobretudo para patógenos de solo, como *Rhizoctonia solani* (HADAR et al., 1979), *Sclerotium rolfsii* (ELAD et al., 1980), *Pythium aphanidermatum* (PATRÍCIO et al., 2001), *Fusarium oxysporum* (SIVAN e CHET, 1989), *Sclerotinia sclerotiorum* (SINGH, 1991) e *Colletotrichum truncatum* (BANKOLE e ADEBANJO, 1996), dentre outros. Também com relação ao controle de doenças foliares, há vários exemplos na literatura indicando o potencial de uso de *Trichoderma* spp. Linhagens desse agente de biocontrole foram selecionadas nas regiões de ocorrência de *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-

bruxa do cacauero e, graças aos esforços desenvolvidos pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, vêm sendo usadas no controle da doença (COSTA, 2003).

Espécies do gênero *Trichoderma* vêm despertando interesse de pesquisadores, também, pelo potencial na solubilização de nutrientes da rizosfera, tornando-os mais disponíveis à absorção pelas raízes e, por conseguinte, reduzindo a necessidade de adubações nas culturas (HARMAN, 2000).

Com a realização deste trabalho, pretendeu-se uma ampliação de recursos no combate de doenças de plantas provocadas pelos fungos *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* através do uso de isolados de *Trichoderma* spp. numa tentativa de minimizar o uso de pesticidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e armazenamento dos isolados de *Trichoderma* spp.

O isolamento foi feito a partir de amostras de solo cultivado com algodoeiro. Para a preparação das amostras utilizou-se 1g de solo acrescido de 9 mL de Tween a 0,05% realizando-se em seguida diluições seriadas. Posteriormente, foram retirados 50 µL das diluições e transferidas para placas de Petri contendo meio Martin modificado por Homechin (MELO e SANHUEZA, 1995). Estas placas foram mantidas em BOD na ausência de luz por cinco dias a temperatura de 25 °C. Após este período, as colônias foram submetidas a análise morfológica ao microscópio óptico para a identificação das estruturas características de *Trichoderma* spp. Aquelas identificadas como *Trichoderma* foram repicadas para posterior purificação em placa de Petri contendo o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Depois de se certificar da pureza das colônias, as mesmas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio BDA e armazenadas em geladeira até o uso. Em todos os experimentos foi usado como padrão o isolado CEN 219, cedido pela empresa ITAFORTE, que o comercializa com o nome de Trichodermil.

O armazenamento dos isolados identificados foi realizado com a utilização de quatro métodos descritos por Figueiredo (2001), como a seguir:

- **Armazenamento em óleo mineral**

Repicaram-se os isolados de *Trichoderma* spp. para frascos de penicilina contendo 7mL de BDA permanecendo estes em BOD, por aproximadamente cinco dias. Após esse período, foram adicionados 5mL de óleo mineral (previamente autoclavado) em condições de assepsia. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente.

- **Armazenamento em água destilada (método de Castellani)**

De colônias com cinco dias de crescimento foram retirados discos de micélio de 4,0 mm de diâmetro, e transferidos para frascos de penicilina contendo água destilada estéril. Após a identificação, os frascos lacrados foram mantidos em geladeira à temperatura de 10 °C.

- **Armazenamento em nitrogênio líquido e congelamento a – 80 °C**

Foram colocados cinco discos com micélio de cada isolado em dois criotubos contendo glicerol a (10%), em volume suficiente para cobrir as amostras. Esses criotubos foram mantidos durante 10 minutos numa temperatura de 10 °C e posteriormente foram transferidos para o congelador, num período de 10 minutos. Finalmente, colocaram-se cinco criotubos identificados, nos suportes metálicos próprios (palhetas) e sendo imediatamente transferidos para o nitrogênio líquido.

Para o congelamento a -80 °C foi realizado o mesmo procedimento do armazenamento em nitrogênio líquido, variando apenas a etapa final, em que estes foram transferidos para um refrigerador a baixa temperatura (-80°C).

2.2. Avaliação da variabilidade dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao crescimento micelial e produção de esporos em meio BD e BDA.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram comparados quanto ao crescimento e esporulação em meio sólido. Para tal, discos de micélio de 4,0 mm foram transferidos para placas de Petri contendo o meio BDA e colocados para crescer em BOD em fotoperíodo de 12 horas a 25 °C. Posteriormente, foram realizadas medições dos diâmetros das colônias após 24, 48 e 72 horas de cultivo. A determinação da concentração de esporos foi avaliada após 72 horas. Para

tanto, foram adicionados 20 mL de solução de Tween (0,05%) sobre as colônias e com auxílio de câmara de Neubauer foi feita a contagem do número de esporos. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado.

O cultivo em meio líquido foi realizado do seguinte modo: dois discos de micélio dos isolados de *Trichoderma* spp. com 4,0 mm de diâmetro, foram transferidos para frascos Erlenmeyers com capacidade para 250 ml, contendo 75 mL de meio Batata +Dextrose (BD) esterilizado. O meio inoculado foi transferido para incubadora com agitação a 150 rpm, durante 12 dias, a 25 °C na ausência de luz. Após este período, determinou-se a concentração de esporos em câmara de Neubauer sob microscópio óptico.

A avaliação do crescimento micelial dos fungos em estudo foi feita através da pesagem do micélio produzido, após filtragem com auxílio de bomba a vácuo e secagem em estufa a 70 °C, durante 24 horas.

2.3. Verificação da capacidade antagonista dos isolados *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro.

2.3.1. Antagonismo em cultura pareada

A verificação do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra os fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *S. rolfii* foi baseada na metodologia de cultura pareada (DENNIS e WEBSTER, 1971b) e a classificação do antagonismo, de acordo com escala descrita por Bell et al. (1982). Discos de colônias dos fungos com seis dias de cultivo foram transferidos para placas de Petri contendo o meio BDA, posicionando em cada placa, em lados opostos, um disco do fitopatógeno e um disco do antagonista. Posteriormente as placas foram mantidas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas pela medição do diâmetro das colônias dos patógenos aos cinco dias após inoculação. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições.

2.3.2. Antagonismo por metabólitos não voláteis

Esta etapa foi conduzida de acordo com metodologia utilizada por Dennis e Webster (1971a) que consistiu na utilização de papel celofane transparente, previamente lavado e autoclavado, o qual foi colocado sobre a superfície do meio de BDA já solidificado em placas de Petri de maneira que o papel ficasse aderido completamente sobre o meio. Em seguida foi colocado sobre o papel celofane um disco de *Trichoderma* spp. As placas foram transferidas para BOD com fotoperíodo de 12 horas a 25 °C, durante 48 horas. Posteriormente, retirou-se o papel celofane e a colônia de *Trichoderma* com todo o cuidado para evitar a queda de esporos no meio, inoculando-se neste mesmo meio o patógeno. As placas foram incubadas para desenvolvimento de colônias, nas mesmas condições anteriores. As avaliações consistiram na medição do diâmetro da colônia no período em que o controle havia ocupado toda a superfície do meio. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado.

2.3.3. Antagonismo por metabólitos voláteis

De cada isolado de *Trichoderma* spp. com seis dias de crescimento foi retirado um disco de micélio de 4 mm de diâmetro e colocado no centro de uma placa com BDA onde cresceu, por 48 horas, em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, substituiu-se a tampa da placa por um círculo de papel celofane previamente lavado e autoclavado (para evitar o contacto entre os dois fungos) e sobrepondo outra placa de igual diâmetro contendo o meio BDA, inoculada na zona central com um disco do patógeno. As placas foram mantidas nas mesmas condições de cultivo anteriormente descritas. As avaliações consistiram na medição do diâmetro da colônia do patógeno, após 72 horas, período em que a colônia do controle (patógeno no meio BDA na ausência de metabólitos) ocupou a área total da placa.

2.4. Verificação do hiperparasitismo de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

O preparo das amostras foi baseado em metodologia utilizada por Moretto et al. (2001) com modificações. Foram retirados três discos de micélio da região de interação entre os dois fungos (antagonista/ patógeno) e colocados em eppendorf, acrescido de 1mL de fixador de Glutaraldeído durante 6 horas, à temperatura ambiente. Retirou-se o fixador das amostras com uma pipeta Pasteur e, imediatamente, colocou-se um volume aproximado de 1mL de tampão fosfato a 0,1M para proceder à lavagem do fixador, repetindo-se este processo por três vezes. Seguidamente, retirou-se o tampão e colocou-se solução de 250µL de tampão a 0,2M e 250µL de tetróxido de Osmium a 4%, em cada eppendorf, permanecendo overnight. Posteriormente, efetuaram-se três lavagens das amostras com tampão fosfato a 0,1M. Em seguida, submetem-se as amostras a uma desidratação num gradiente de etanol a 30, 50, 70 (2x), 90 (2x) e a 100% (3x), durante 30 minutos em cada concentração. Na concentração de 100% as amostras foram mantidas em geladeira por 30 minutos.

Depois de terem sofrido secagem até ao ponto crítico foram colocados os três discos de micélio em cada suporte metálico (stub) sobre uma fita adesiva de carbono, colocando uma gota de cola de prata na margem dessa fita de modo a permitir uma melhor condução do feixe de elétrons. As amostras foram metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura.

2.5. Avaliação do efeito antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii* em plantas de soja e feijão.

Para produção dos inóculos do fitopatógeno e dos isolados de *Trichoderma* spp. discos de micélio dos fungos foram cultivados inicialmente em BDA por cinco dias e, posteriormente, transferidos para frascos contendo arroz parboilizado umedecido em água destilada (60% p/v), sendo esterilizado a 120 °C por 20 minutos. O cultivo ocorreu em incubadora tipo BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante seis dias. Vasos contendo solo estéril, com capacidade para 500g, foram contaminados com o patógeno e com os isolados de *Trichoderma*

simultaneamente na proporção de 5g de arroz colonizado por Kg de solo. Após 24 horas da contaminação fez-se o semeio das culturas.

Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo a repetição representada por um vaso com quatro plantas em delineamento inteiramente casualizado. A avaliação foi realizada pela determinação da porcentagem de plantas vivas, aos 20 dias após inoculação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção e caracterização morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp.

Foram obtidos nove isolados de *Trichoderma harzianum* identificados com os seguintes códigos: CEN 234, CEN 235, CEN 236, CEN 237, CEN 238, CEN 239, CEN 240, CEN 241 e CEN 257.

3.2. Avaliação da variabilidade dos isolados de *Trichoderma* quanto ao crescimento micelial e produção de conídios em meio BD e BDA.

Os resultados referentes ao crescimento e esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. em meio BDA, estão apresentados nas figuras 1 e 2. Observou-se variabilidade entre os isolados quanto ao crescimento nos períodos de 24 h e 48h de avaliação, sendo que os isolados CEN 234 e CEN 235, superaram os demais. Entretanto no período de 72 horas, todos os isolados cresceram sobre a superfície do meio, atingindo o diâmetro de 9,0 cm (Figura 1).

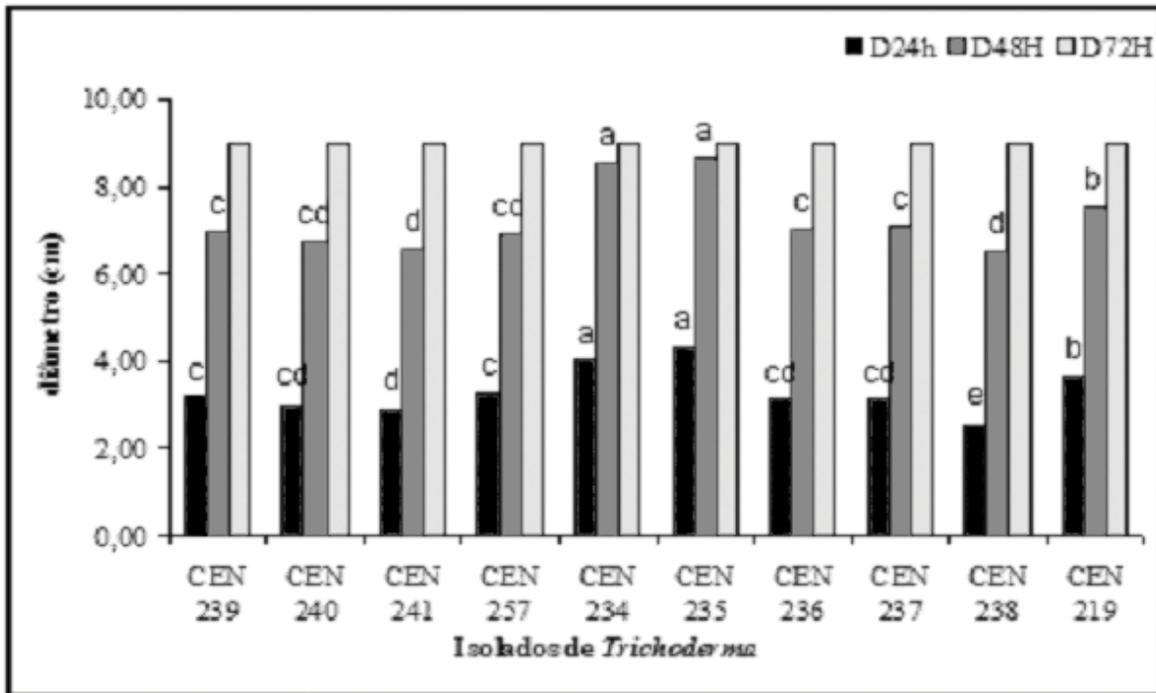


Figura 1. Avaliação do crescimento das colônias de isolados de *Trichoderma* spp. em 24, 48, e 72 horas de cultivo em BDA. Barras referidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto à esporulação em meio sólido (BDA), após 72 horas de crescimento, verificou-se que houve variabilidade significativa entre os isolados de *Trichoderma* (Figura 2).

Os isolados CEN234, CEN235, CEN239, CEN240 e CEN241 apresentaram maiores taxas de esporulação. Por outro lado, aqueles que demonstraram menor capacidade de produção de esporos em meio sólido foram CEN219, CEN238 e CEN257.

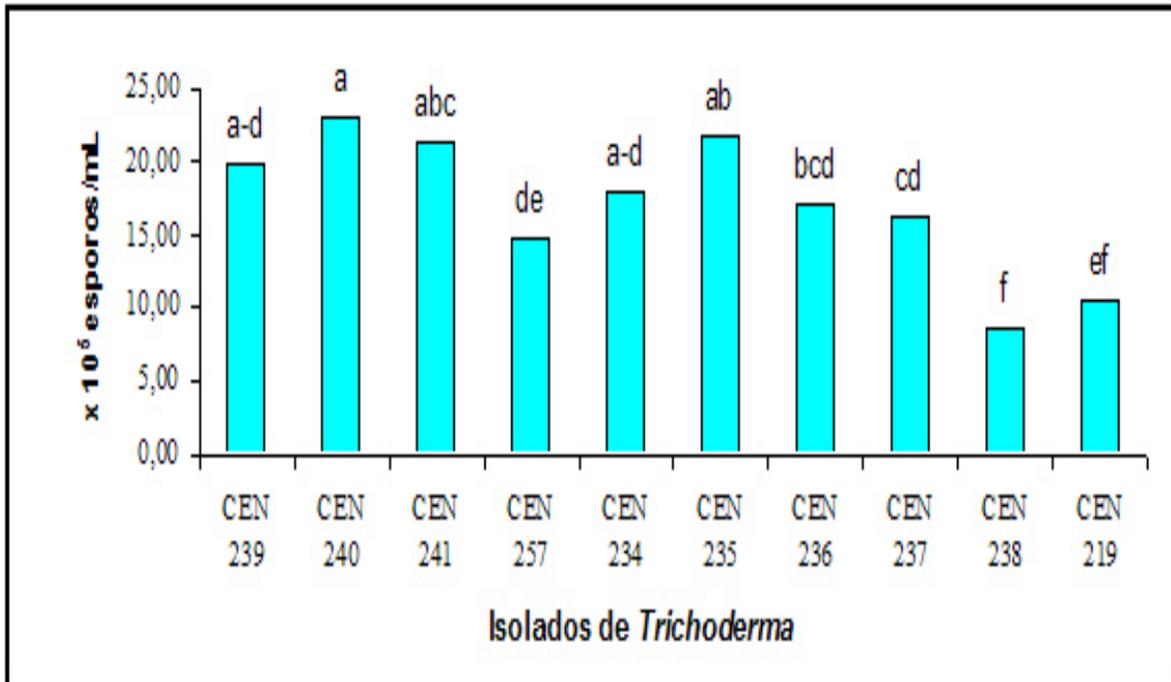


Figura 2. – Concentração de esporos de isolados de *Trichoderma* em meio BDA, após 72 horas de cultivo. Barras referidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados de crescimento e esporulação dos isolados de *Trichoderma* em meio líquido BD estão apresentados na Figura 3. Verificou-se novamente variabilidade significativa dos valores. Assim sendo, com capacidade superior de esporulação destacaram os isolados CEN219, CEN234, CEN 235, CEN236, CEN237 e CEN239. O isolado CEN 238 apresentou os valores mais inferiores seguido do CEN 240 e CEN 241.

No que diz respeito à quantidade de micélio produzido observou-se que o isolado CEN219 superou os demais.

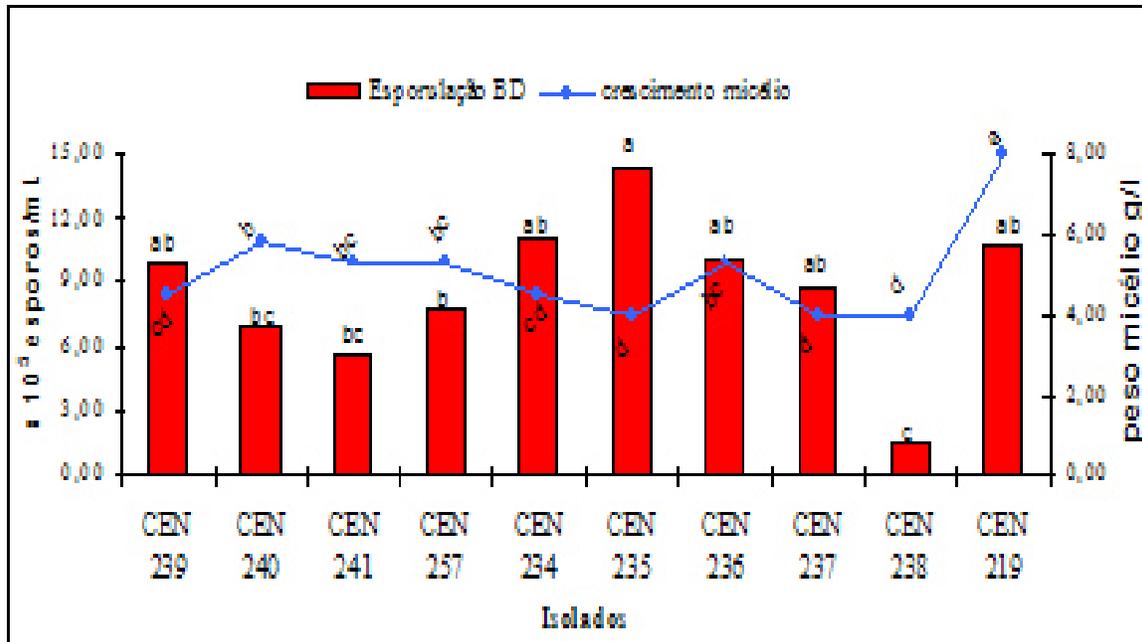


Figura 3. Produção micelial e esporulação de isolados de *Trichoderma* em meio BD. Barras referidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estudos envolvendo crescimento e esporulação de isolados de *Trichoderma* in vitro são importantes, pois fornecem informações que poderão ser úteis na produção em grande escala em termos de seleção de meios de cultivo (PAPAVIZAS, 1985).

Vale ressaltar que a capacidade de alguns isolados de *Trichoderma* apresentarem maior padrão de crescimento, bem como maior produção de esporos, pode ser um fator favorável ao serem utilizados como agentes de biocontrole, pois poderão colonizar mais rapidamente os fitopatógenos alvos. Além disso, a capacidade de crescimento rápido e esporulação em meios simples e baratos como este à base de batata, indica que esses isolados não são muito exigentes em termos nutricionais, característica esta que confere vantagem na seleção de agentes de biocontrole.

Foi possível destacar os isolados CEN234, CEN235 e CEN239, em termos de produção de esporos, uma vez que estes mantiveram constante a esporulação, tanto em meio líquido, quanto em meio sólido, apresentando valores altamente significativos.

3.3. Verificação da capacidade antagonista dos isolados *Trichoderma* spp. contra *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* in vitro, em cultura pareada.

3.3.1. Antagonismo em cultura pareada

Através da análise dos resultados observou-se que, quanto ao antagonismo in vitro dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o patógeno *S. rolfsii*, todos os isolados mostraram a capacidade em inibir o seu crescimento havendo, no entanto, diferença significativa entre os mesmos (Figura 4). Os isolados CEN234, CEN235, CEN239, CEN240, CEN241 e CEN257 apresentaram maiores percentagens de redução. Este fato mostrou-se interessante uma vez que estes isolados demonstraram resultados semelhantes ao CEN219, tratando-se este de um isolado já estudado e usado comercialmente no controle biológico. Por outro lado, os isolados CEN236, CEN237 e CEN238 apresentaram os menores valores percentuais, classificando-se assim como menos eficazes quanto à capacidade antagonista in vitro, contra *S. rolfsii*, por este método.

Com respeito ao antagonismo in vitro, os isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* havendo, no entanto, diferença significativa entre os mesmos (Figura 5). Os isolados CEN219, CEN234, CEN235, CEN239 e CEN257, apresentaram maiores valores médios de porcentagens de inibição. Por outro lado, os isolados CEN240 e CEN241 apresentaram os menores valores percentuais, classificando-se assim como menos eficazes quanto à capacidade antagonista in vitro.

De acordo com a classificação de Bell et al. (1982), dos 10 isolados avaliados, três (CEN219, CEN234, CEN235) apresentaram nota 2, sendo classificados como altamente antagonísticos a *S. rolfsii*. Para *S. sclerotiorum* maior número de isolados recebeu esta classificação, além dos três acima citados, também os isolados CEN236, CEN238, CEN239 e CEN257 (Tabela 1).

A redução de crescimento de *S. rolfsii* e de *S. sclerotiorum* pode ser atribuída à competição por espaço e por nutrientes presentes no meio de cultura, como também pela liberação de substâncias tóxicas. Este efeito também foi relatado por Bell et al. (1982), ao avaliar o antagonismo de diversos isolados de *Trichoderma* frente a diversos fitopatógenos.

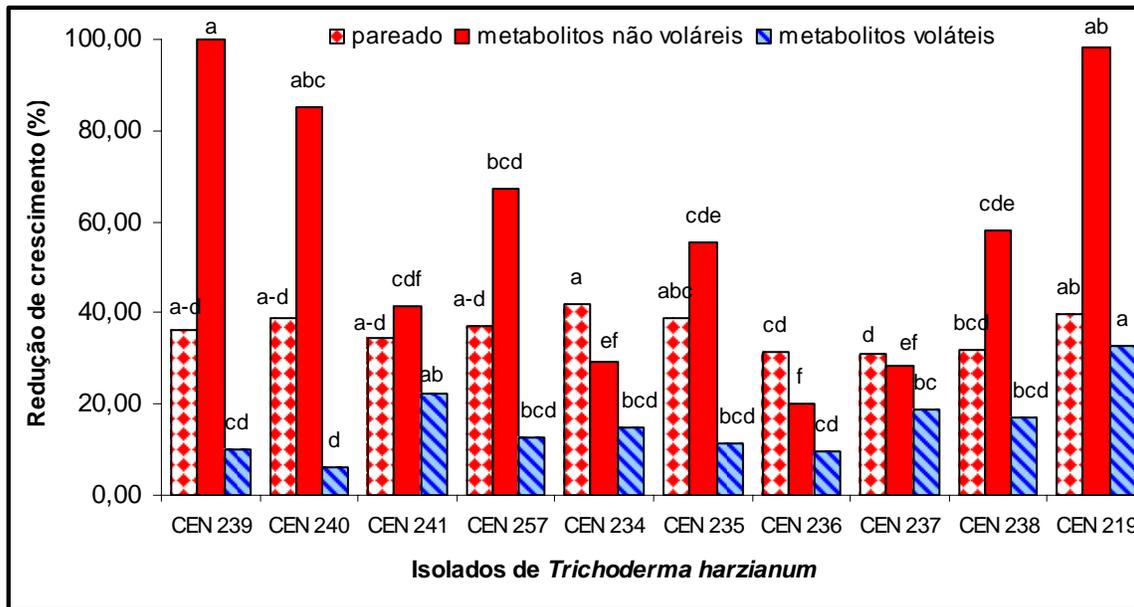


Figura 4. Capacidade de inibição do crescimento de *Sclerotium rolsii* pelos isolados de *Trichoderma* spp., pela produção de metabólitos não voláteis e voláteis e em cultura pareada. Barras referidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

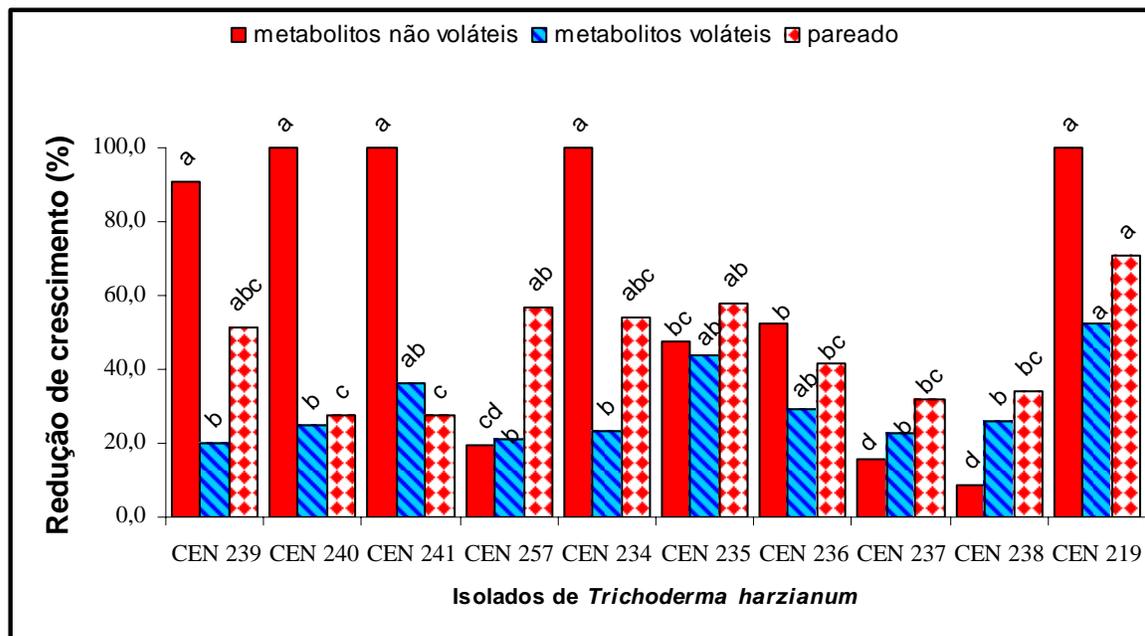


Figura 5. Capacidade de inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* pelos isolados de *Trichoderma* spp., pela produção de metabólitos não voláteis, voláteis e cultura pareada. Barras referidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Classificação de isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* segundo escala de Bell et al. (1982).

ISOLADOS	<i>S.rolfsii</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
CEN 219 (<i>T. atroviride</i>)	2	2
CEN 234 (<i>T. harzianum</i>)	2	2
CEN 235 (<i>T. harzianum</i>)	2	2
CEN 236 (<i>T. harzianum</i>)	4	2
CEN 237 (<i>T. harzianum</i>)	4	2,5
CEN 238 (<i>T. harzianum</i>)	3	2
CEN 239 (<i>T. harzianum</i>)	2,5	2
CEN 240 (<i>T. harzianum</i>)	2,5	3
CEN 241 (<i>T. harzianum</i>)	4	3
CEN 257 (<i>T. harzianum</i>)	3	2

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* e o patógeno 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.

3.3.2. Antagonismo por metabólitos não voláteis

Nos testes de produção de substâncias tóxicas não voláteis, os resultados obtidos demonstraram que todos os isolados em estudo, provocaram redução de crescimento do patógeno *S. rolfsii* (Figura 4).

Com redução de 100% do crescimento do fitopatógeno, verificou-se que os isolados CEN219, CEN239 e CEN240 apresentaram maior capacidade de sintetizar metabólitos não voláteis inibitórios. Os isolados CEN234, CEN236 e CEN237 demonstraram capacidade mínima na produção de metabólitos. Fato que reforça a idéia de que estes isolados de *Trichoderma* spp. podem exercer a sua capacidade antagonista por outros meios de inibição.

Resultados semelhantes foram obtidos para *S. sclerotiorum*, sendo que todos isolados em estudo provocaram a redução de seu crescimento (Figura 5). Verificou-se que os isolados CEN240, CEN241, CEN234, CEN219 e CEN239 foram os que proporcionaram maiores valores de redução do crescimento de *S. sclerotiorum*, não diferindo estatisticamente entre si. Por sua vez os isolados CEN237 e CEN238 demonstraram uma capacidade mínima de produção de metabólitos não voláteis, o que mostra que estes últimos isolados podem exercer a sua função antagonista por outros meios que não por produção de metabólitos

não voláteis. A inibição do crescimento de diversos fitopatógenos pela produção de substâncias não voláteis foi amplamente estudada por Dennis e Webster (1971a). Eles relataram que a habilidade de espécies de *Trichoderma* produzirem tais substâncias (antibióticos) variou entre isolados e que a susceptibilidade dos fungos também foi variável. De acordo com os autores foram identificados os antibióticos trichodermina e peptídico.

3.3.3. Antagonismo por metabólitos voláteis

Quanto à avaliação de substâncias voláteis verificou-se que houve variação na produção dos mesmos pelos diferentes isolados (Figura 4). Os isolados CEN219 e CEN241 apresentaram maiores inibições do crescimento de *S. rolfsii* pela produção de metabólitos tóxicos.

Para *S. sclerotiorum* verificou-se que houve variação na produção dos mesmos pelos diferentes isolados (Figura 5). Os isolados que demonstraram maior inibição foram CEN219, CEN235, CEN241 e CEN 236 ocasionando redução de 52,7%, 43,9, 36,25 e 29,3%, respectivamente. Os demais isolados foram semelhantes entre si não havendo diferença significativa, ocasionando redução de 20 a 25,9%.

Esses resultados são interessantes, pois demonstram a capacidade destes isolados produzirem substâncias voláteis com potencial para inibir o crescimento dos fitopatógenos, confirmando os resultados obtidos por vários autores (SILVA-RIBEIRO, 2001; DENNIS e WEBSTER, 1971b; KEXIANG et al. 2002).

Segundo Mangelot e Dien (1979, citados por LOBO JUNIOR e ABREU, 2000), os metabólitos voláteis possuem vantagens sobre aqueles não voláteis, pois difundem em interstícios e, também, na solução do solo, quando solúveis em água.

Apesar dos isolados aqui avaliados não apresentarem valores altos de inibição por metabólitos voláteis, é interessante a realização de estudos envolvendo a utilização de diversas temperaturas, pois de acordo com os resultados obtidos por Lobo Junior e Abreu (2000), há diferença na inibição dos fitopatógenos dependendo da temperatura utilizada.

3.4. Verificação do micoparasitismo de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

Através da microscopia eletrônica foi possível visualizar o parasitismo de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* pelos isolados de *Trichoderma* spp. através do enrolamento das hifas dos antagonistas (Figuras 6.1 a 7.2, respectivamente). A tabela 2 mostra que a maioria dos isolados parasitou os patógenos, indicando assim outro mecanismo de ação destes isolados.

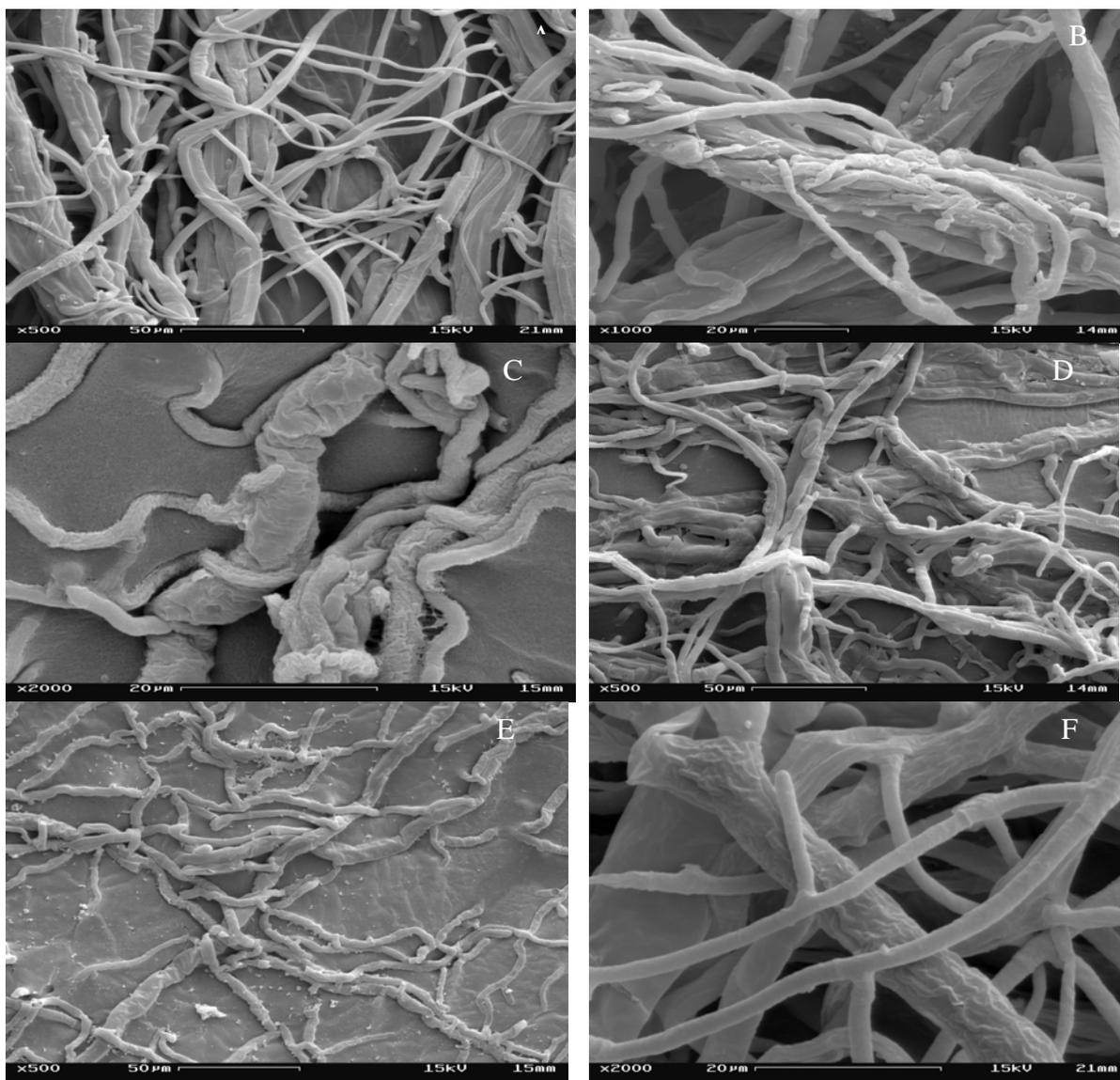


Figura 6.1. Fotografias da microscopia eletrônica de varredura mostrando a presença ou não de parasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp. estudados contra o patógeno *Sclerotium rolfsii*. **A** - *Sclerotium rolfsii*; **B** - isolado de *Trichoderma* CEN 239 e **C** - isolado de *Trichoderma* CEN 240, parasitando o patógeno; **D** - isolado CEN 241, **E** - isolado CEN 257 e **F** - isolado CEN 234, não apresentando parasitismo.

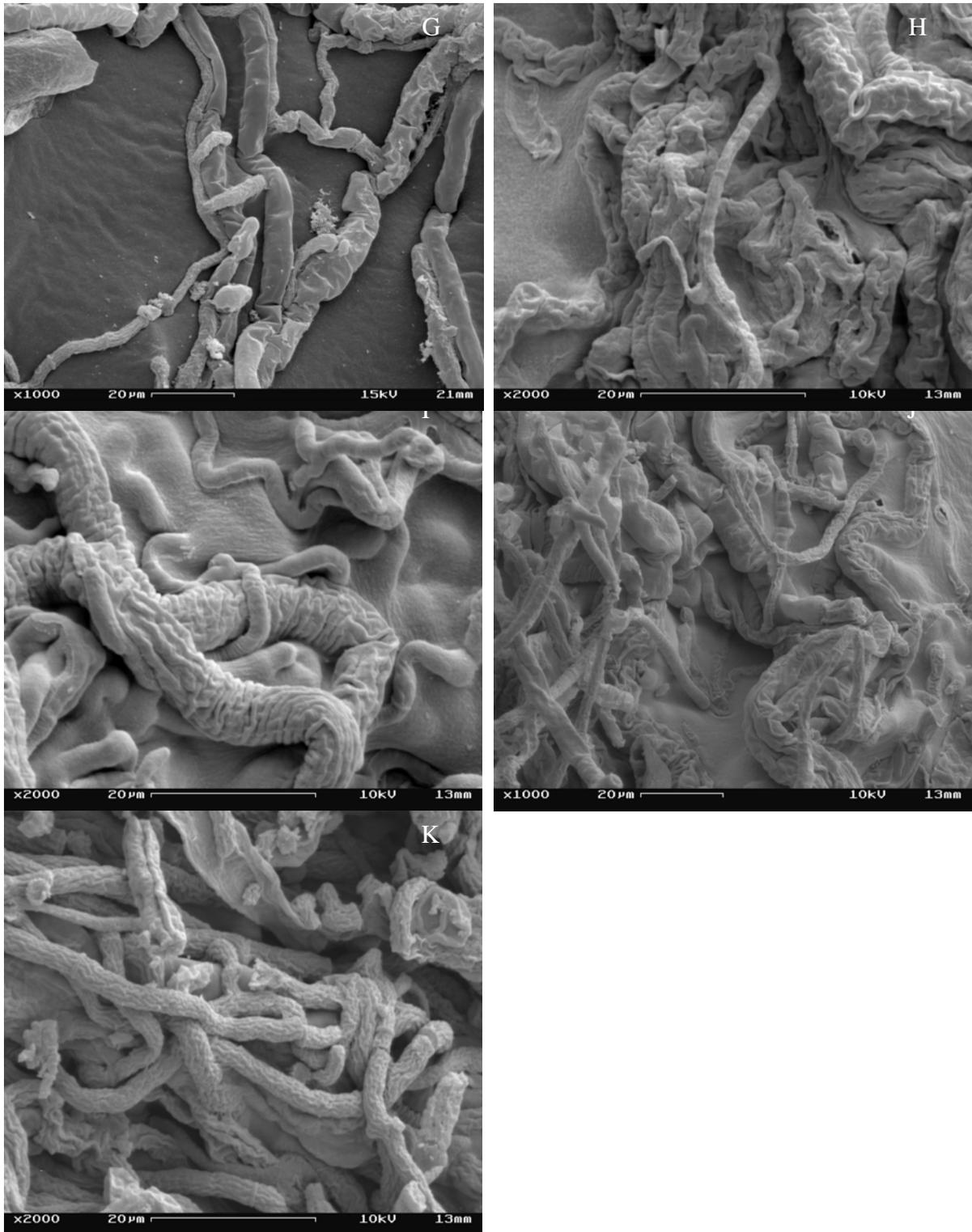


Figura 6.2. Fotografias da microscopia eletrônica de varredura mostrando a presença ou não de parasitismo de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotium rolfsii*. **G** – isolado CEN 219 demonstrando parasitismo; **H** – isolado CEN 235 não apresentando parasitismo; **I** – isolado CEN 236, apresentando parasitismo; **J** – isolado CEN 237 não apresentando parasitismo; **K** – isolado CEN 238 apresentando parasitismo.

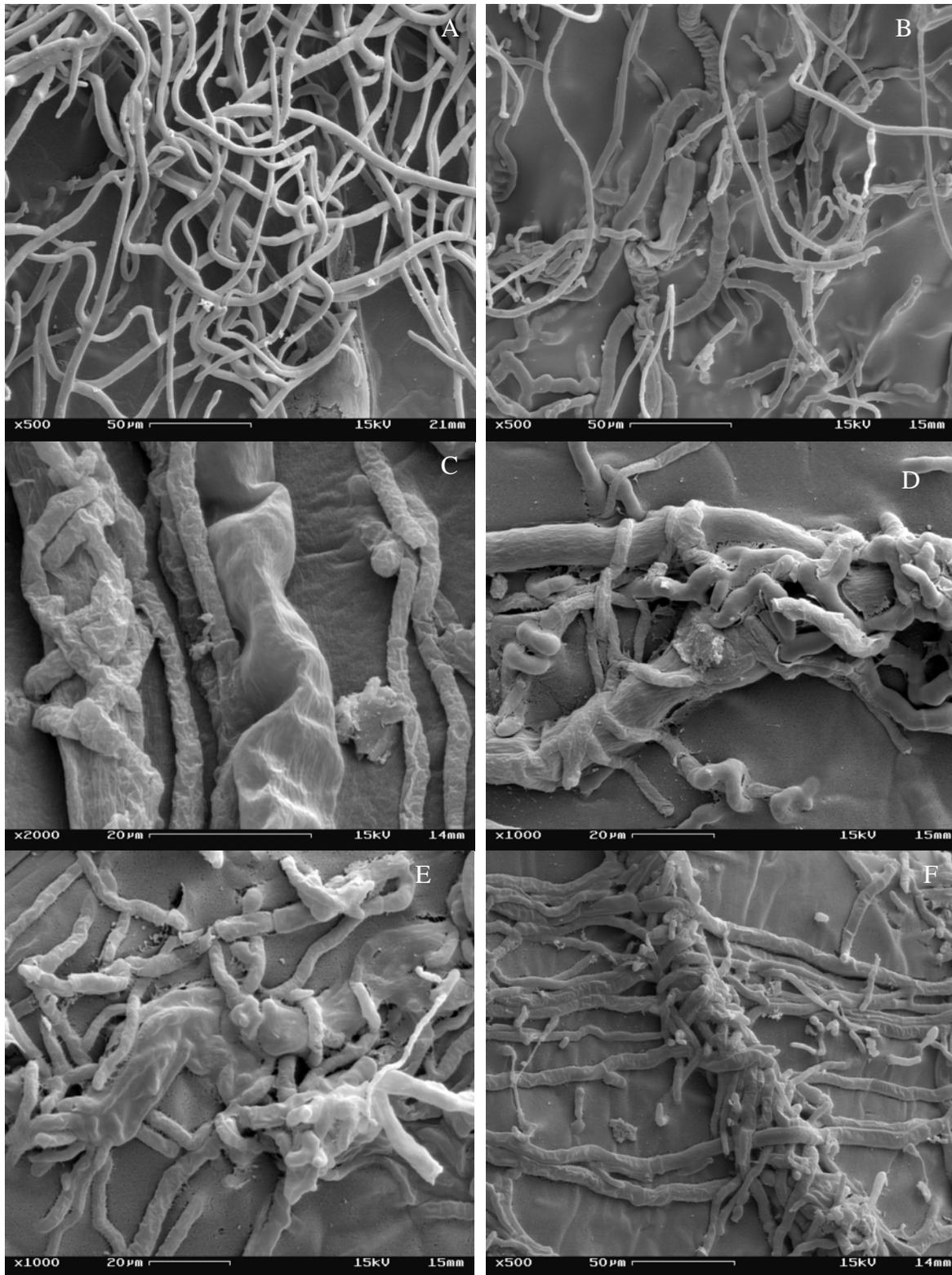


Figura 7.1. Fotografias da microscopia eletrônica de varredura mostrando a presença ou não de parasitismo de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **A** – *Sclerotinia sclerotiorum*; **B** – isolado de *Trichoderma* CEN 239, único deste grupo que não apresentou enrolamento das hifas, todos os restantes: **C** – isolado CEN 240; **D** - isolado CEN 241, **E**- isolado CEN 257, **F**- isolado CEN 234, apresentaram forte parasitismo caracterizado por enrolamento e penetração.

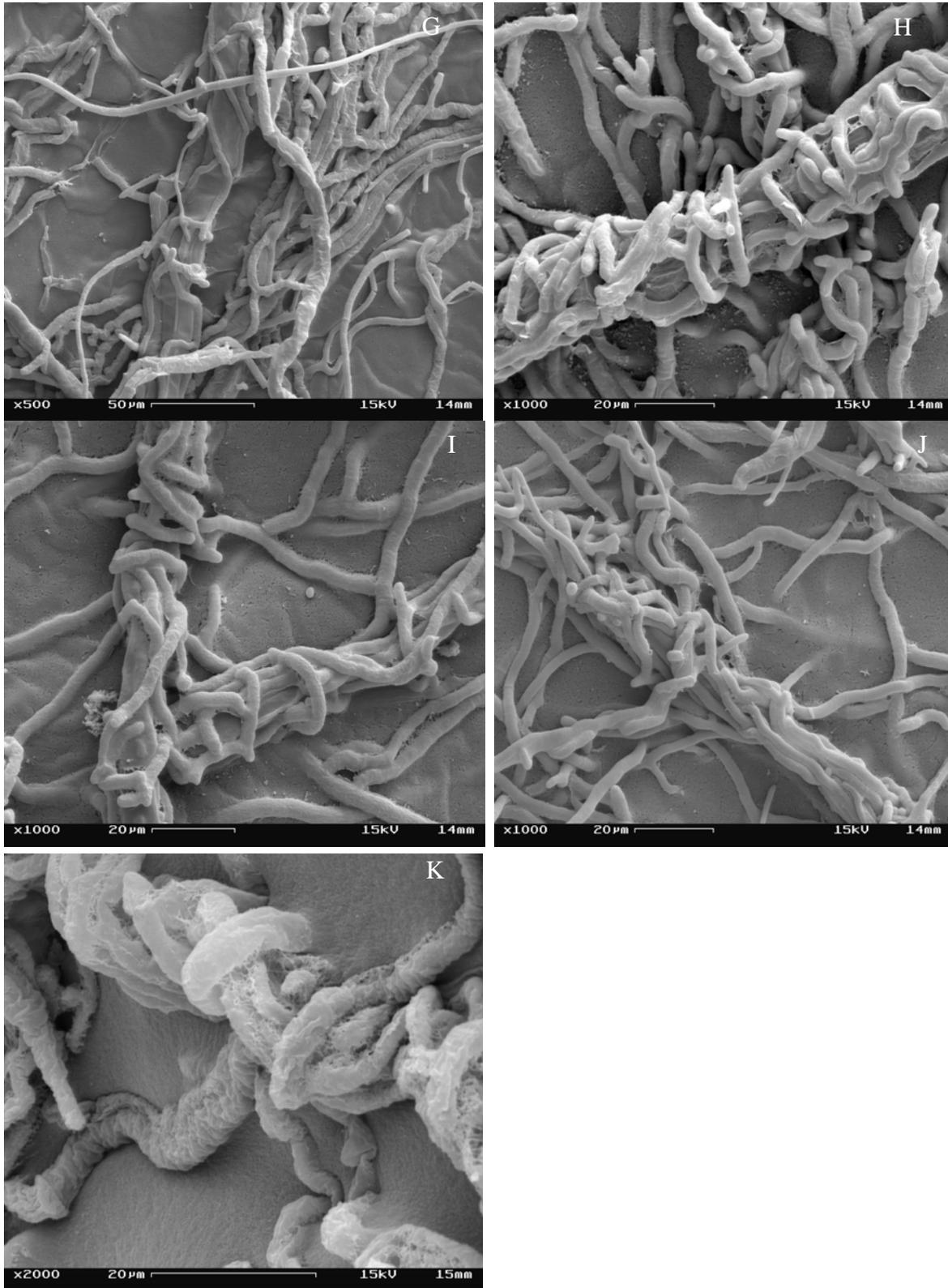


Figura 7.2. Fotografias da microscopia eletrônica de varredura mostrando a presença de parasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **G** - isolado CEN 235, **H** - isolado CEN 236, **I** - isolado CEN 237, **J** - isolado CEN 238 e **K** - isolado CEN 219.

Tabela 2. Parasitismo sobre *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* por diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Interação hifálica e/enrolamento com ou sem penetração (parasitismo)		
Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
CEN 219 (<i>T. atroviride</i>)	+	+
CEN 234 (<i>T. harzianum</i>)	-	+
CEN 235 (<i>T. harzianum</i>)	-	+
CEN 236 (<i>T. harzianum</i>)	+	+
CEN 237 (<i>T. harzianum</i>)	-	+
CEN 238 (<i>T. harzianum</i>)	+	+
CEN 239 (<i>T. harzianum</i>)	+	-
CEN 240 (<i>T. harzianum</i>)	+	+
CEN 241 (<i>T. harzianum</i>)	-	+
CEN 257 (<i>T. harzianum</i>)	-	+

+ :presença de interação

-: ausência de interação

3.5. Avaliação do efeito antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii* em plantas de soja e feijão.

As figura 9 e 10 ilustram o controle de *S. rolfsii* em plantas de soja e feijão. Foi possível observar que os isolados mostraram a capacidade de inibir o patógeno *S. rolfsii* sem diferirem estatisticamente entre si, confirmando os resultados obtidos in vitro (Figura 8). A taxa de redução da doença variou de 75 a 100%. Destaque pode ser dado aos isolados CEN 234 e CEN235, que proporcionaram 100% de controle da doença, representado pela porcentagem de plantas sobreviventes.

Relativamente ao controle de *S. rolfsii* em plantas de feijão, verificou-se diferença significativa entre os isolados. Maiores porcentagens de plantas sobreviventes foram obtidas com os isolados CEN219, CEN235, CEN237, CEN238 e CEN240 que não diferiram significativamente do controle (sem inóculo).

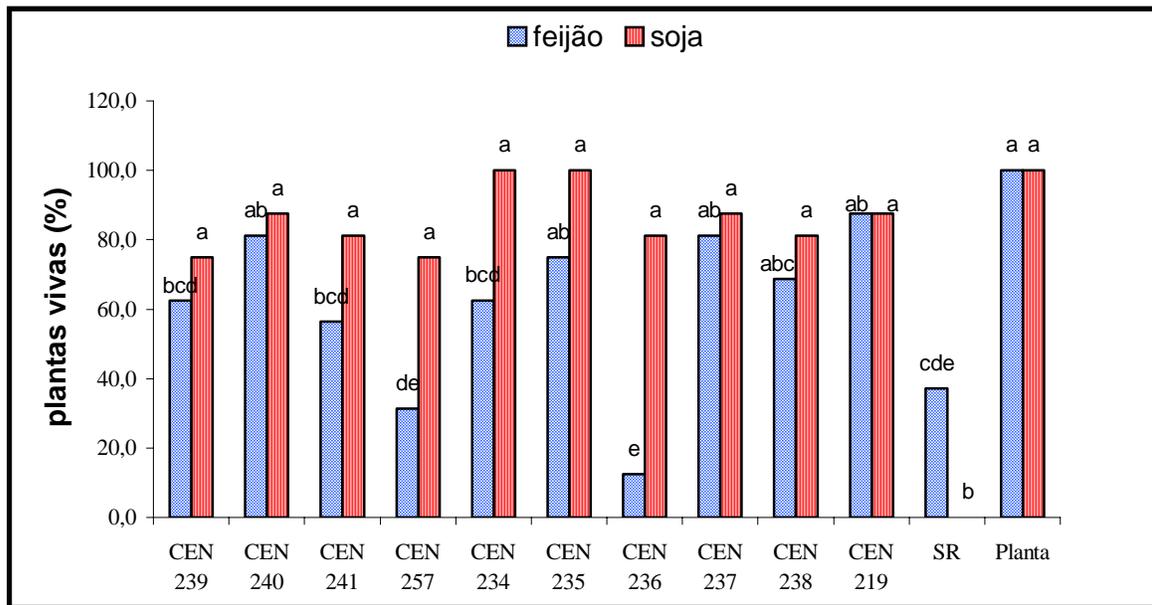


Figura 8. Avaliação do potencial antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o patógeno *Sclerotium rolfsii*, pela percentagem de plantas vivas em culturas de feijão e soja.



Figura 9. Controle de *Sclerotium rolfsii* em planta de soja. I) Planta inoculada com *Trichoderma* e o patógeno, II) Planta inoculada só com o patógeno, III) Planta não inoculada.



Figura 10. Controle de *Sclerotium rolfsii* em planta de feijoeiro. I) Planta não inoculada, II) Planta inoculada só com o patógeno apresentando sintoma de tombamento, III) Planta inoculada com *Trichoderma* e o patógeno.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKOLE, S. A.; ADEBANJO, A. Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*. **Crop Protection**, Oxford, v.15, p.633-636,1996.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, USA, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

COSTA, J. C. B. Situação atual do controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero com o uso de *Trichoderma* spp. na Bahia. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 8., 2003, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus, BA: [S.I.], 2003. p. 63-69.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, I Production of non-volatile antibiotics. **Transactions British Mycological Society**, v.57, p. 25-39, 1971a.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v.57, p. 363-369, 1971b.

ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, USA, v.70, p. 119-121, 1980.

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos fitopatogênicos. **O Biológico**, São Paulo, v. 63, n.1/2, p. 59-68, 2001.

HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Saint Paul, USA, v. 69 p. 64-68, 1979.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Saint Paul, USA, v.84, n.4, 2000.

JACK, A.; LEWIS, I.; PAPAIVIZAS, G. C. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. **Crop Protection**, Oxford, v.10, p. 95-105, 1991.

KEXIANG, G.; XIAO GUANG, L.; YONGHONG, L.; TIANBO, Z.; SHULIANG, W. Potencial of *Trichoderma harzium* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengerianaf. sp. piricola*, the Cause of Apple Ring Rot. **Phytopathology**, Saint Paul, USA, v. 150, p. 271-276, 2002.

LOBO JÚNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonista em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 24, n.2, p.521-526, 2000.

MELO, I. S.; SANHUEZA, R. M. (Coord.) **Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos**: Manual Técnico. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. 72 p. (EMBRAPA-CNPMA. Documentos, 4).

MORETTO, K. C. K.; GIMENES-FERNANDES, N.; SANTOS, J. M. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of Tahiti lime detached flowers. **Summa phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 27, n.4, p. 357-364, 2001.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, USA, v.23, p.23-54, 1985.

PATRICIO, R. F. A.; KIMATI, H.; BARROS, B. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v.27, p.223-229, 2001.

SILVA-RIBEIRO, R. T.; TERMIGNONI, C.; DILLON, A. J. P.; HENRIQUES, J. A. P. Efeito letal de cinco linhagens de *Trichoderma* spp sobre o fitopatógeno *Boryitis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v.27, p. 364-369, 2001.

SING, D. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary by *Trichoderma harzianum*. **Tropical Pest Management**, London, v.37, n.4, p.374-378, 1991.

SIVAN, A.; CHET, I. Microbial control of plant diseases. In: CHET, I. (Ed.) **Environmental Microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 335-354.

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