

Avaliação da Atividade Antagônica *in vitro* de Isolados de *Trichoderma* s para Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*

Oliveira, T.A.S¹
Carvalho, D.D.C¹
Mello, S.C.M^{2*}

O controle biológico de patógenos de plantas possui uma série de vantagens em relação aos pesticidas convencionais. Enquanto os fungicidas apresentam 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 (ÁVILA et al., 2005), além de constituírem uma alternativa para diminuir o potencial de inóculo do solo sem trazer danos ao meio ambiente (MELLO et al., 2007).

Fungos antagônicos do gênero *Trichoderma* (Pers.), são aqueles que produzem enzimas capazes de degradar diversos materiais e lisar parede de células de fungos. Atuam, também, por meio da produção de antibióticos voláteis e não-voláteis (MELO, 1996). Os fungos pertencentes a esse gênero são naturais do solo, e podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (MELO, 1998). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um fungo de solo que tem extensa distribuição nos climas temperados e subtropicais, causando

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

² Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70770-900, Brasília - DF. *e-mail: smello@cenargen.embrapa.br

murcha e morte em distintas espécies de plantas, incluindo o feijoeiro (CANDOM et al., 2000). O 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; AVILA et al., 2005), *Pythium aphanidermatum* (PATRÍCIO et al., 2001), *Sclerotinia sclerotiorum* (SINGH, 1991; AVILA et al., 2005) e *Colletotrichum truncatum* (BANKOLE E ADEBANJO, 1996).

Tendo em vista a necessidade de se desenvolver método eficaz de controle dessa doença, este trabalho objetivou testar o efeito *in vitro* de 10 isolados de fungos do gênero *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum* e estudar interações *in vitro* entre o patógeno e o agente de biocontrole por microscopia de luz.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Trichoderma* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*

Os isolados de *Trichoderma* spp. 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 seguintes isolados de *Trichoderma* spp. (CEN 304, CEN 308, CEN 311, CEN 315, CEN 316, CEN 320, CEN 329, CEN 330, CEN 332 e CEN

334) e o isolado C-03-02 de *S. Sclerotiorum*.

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

A verificação do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* 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 previamente o estabelecimento do patógeno (crescimento sobre 1/3 da placa de Petri). Para isso, discos de cultura (5 mm) contendo micélio de *S. sclerotiorum*, com seis dias de cultivo, foram repicados dois dias antes da introdução do agente biocontrolador. Os discos de *Trichoderma* e do patógeno foram colocados, em lados opostos, em cada placa contendo meio Batata-dextrose-ágar (BDA) solidificado e os experimentos conduzidos em triplicata. As placas foram mantidas em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas (ÁVILA et al., 2005). Após sete dias de cultivo dos dois fungos na mesma placa, procederam-se as avaliações, que consistiram na medição do crescimento radial das colônias de *S. sclerotiorum*. Os valores médios de crescimento micelial obtidos foram, então, utilizados para análise estatística, empregando-se o teste de Scott e Knott (1974) a 5 % de probabilidade. Adicionalmente, foi realizada a classificação do antagonismo,

de acordo com escala descrita por Bell et al. (1982).

Verificação do hiperparasitismo de *Trichoderma* sp. sobre *S. sclerotiorum*.

Para obtenção de zonas de confronto dos dois fungos, o isolado de *Trichoderma* CEN 316 foi cultivado juntamente com o patógeno em cultura pareada, durante 10 dias (CARPENTER et al., 2005). Após esse período, com 83% da placa de Petri colonizada pelo antagonista, discos de micélio provenientes da região de confronto dos dois fungos, foram removidos para lâminas microscópicas e observados em microscópio de luz Leica Microstar IV. Este experimento foi conduzido em triplicata e as imagens capturadas com câmera digital Sony cyber shot 6.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Dentre os isolados de *Trichoderma* testados, CEN 316, CEN 334 e CEN 311 foram os que apresentaram maior atividade antagonista aos sete dias de cultivo pareado, reduzindo o crescimento

médio do patógeno a um valor (4,96 cm) significativamente inferior aos demais tratamentos (Tabela 1).

De acordo com a classificação de Bell et al. (1982), dos 10 isolados avaliados, somente CEN 316 apresentou nota 1, ocupando em média, 83% da superfície do meio e colonizando o patógeno, sendo classificado como altamente antagonico a *S. sclerotiorum*, aos 10 dias de cultivo simultâneo dos fungos (Tabela 1). Por outro lado, os demais isolados, classificados com as notas 3 e 4, mostraram-se menos eficazes quanto a capacidade antagonista *in vitro*. Resultados similares foram obtidos por Mello et al. (2007), em que vários isolados de *Trichoderma* pertencentes a essa coleção, ao serem testados pelo método de cultivo pareado, foram capazes de inibir o crescimento de *Sclerotium rolfsii*, colonizando totalmente o patógeno. A redução de crescimento 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 Ávila et al. (2005), ao avaliar o antagonismo de outros isolados de *Trichoderma* contra *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

Tabela 1 – Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* ao 7º dia de cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* spp. e classificação dos isolados quanto ao antagonismo, segundo escala de Bell et al. (1982)*, ao 10º dia de cultivo pareado.

| Isolado de <i>Trichoderma</i> sp. | Crescimento das colônias de <i>S. sclerotiorum</i> (cm) ao 7º dia** | <i>Trichoderma</i> sp. quanto ao antagonismo ao 10º dia* |
|-----------------------------------|---|--|
| CEN 316 | 4,9 a | 1 |
| CEN 334 | 4,9 a | 4 |
| CEN 311 | 4,9 a | 3 |
| CEN 308 | 5,0 a | 3 |
| CEN 330 | 5,7 b | 4 |
| CEN 329 | 5,7 b | 4 |
| CEN 315 | 5,7 b | 3 |
| CEN 320 | 6,4 c | 4 |
| CEN 332 | 6,4 c | 4 |
| CEN 304 | 6,5 c | 3 |
| Coeficiente de variação | 6,67% | - |

*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 pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

Verificação do hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum*.

Interações entre o antagonista e o patógeno foram confirmadas (Figura 1A).

As figuras 1B e 1C mostram hifas de *Trichoderma* crescendo em torno das hifas de *S. sclerotiorum* forma verificadas. Além disso, foi observado o crescimento do antagonista por toda extensão das hifas do patógeno (Figura 1D). Interações entre os dois fungos

ocorreram em todas as repetições do tratamento. Estes resultados estão de acordo com Inbar et al. (1996) e Ávila et al. (2005), que verificaram, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de luz, interações semelhantes entre hifas de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* em condições *in vitro* de cultivo simultâneo.

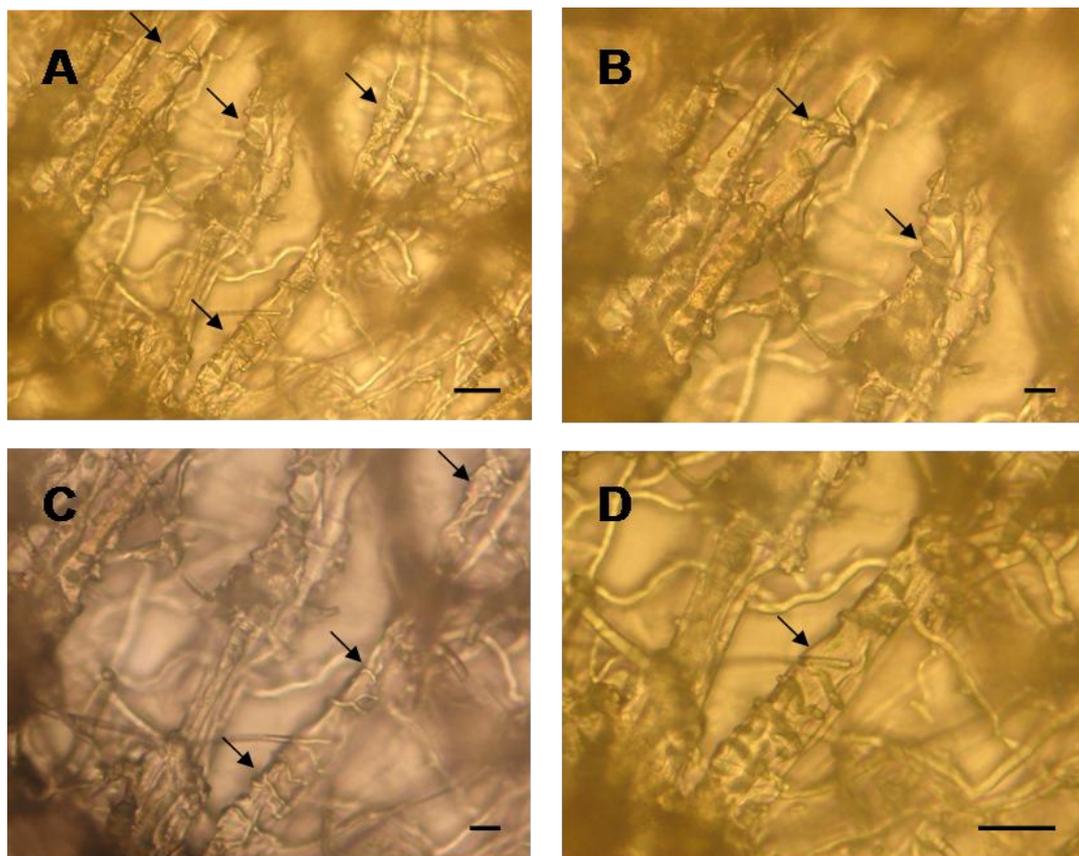


Fig. 1 – Estudos de microscopia de luz da interação entre *Trichoderma* sp. (isolado CEN 316) e *Sclerotinia sclerotiorum*: **A)** Interações entre antagonista e patógeno; **B)** Hifa de *Trichoderma* sp. crescendo e se enrolando em uma hifa de *S. sclerotiorum*; **C)** Setas mostrando uma hifa de *S. sclerotiorum* colonizada pelo antagonista; **D)** Hifa de *S. sclerotiorum* com 30 μm de diâmetro colonizada pelo antagonista, em maior aumento. (Bars = 32; 19; 20 e 30 μm para as figuras 1A, 1B, 1C e 1D, respectivamente).

Agressividade elevada e capacidade de colonização do isolado CEN 316 de *Trichoderma* sp. sobre *S. sclerotiorum* foi verificada aos 10 dias de cultivo. Logo, estudos posteriores deverão ser realizados para averiguar o efeito antagônico deste isolado em condições de campo e de casa-de-vegetação.

REFERÊNCIAS

ÁVILA, Z. R.; CARVALHO, S. S.; BRAÚNA, L. M.; GOMES, D. M. P. A.; MELLO, S. C. M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília, DF: Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 30 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 117).

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, Minn., v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

CANDOM, M. A.; MAZZA DE GALAD, S. M.; MAZZANTI DE CASTAÑN, M. A.; GUTIRREZ, S. A. **Actividad antagônica *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp., sobre esclerocios de *Sclerotinia***

sclerotiorum. Corrientes, Argentina: UNNE, 2000. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas). Disponível em: <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2000/5_agrarias/a_pdf/a_042.pdf>.

CARPENTER, M. A.; STEWART, A.; RIDGWAY, H. J. Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridization. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v. 251, p. 105-112, 2005.

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.

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.

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

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, NY, US, v. 28, n. 6, p. 757-763, 1996.

MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; BRAÚNA, L. M.; PÁDUA, R. R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n. 1, p. 3-9, 2007.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v.1., p. 18-67.

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.

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.

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

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

**Comunicado
Técnico, 177**

**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):

**Comitê de
Publicações**

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

Membros: Arthur da Silva Mariente
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: *Ligia Sardinha Fortes*

Editoração eletrônica: Maria da Graça S. P. Negrão

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

