



## Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* do feijão comum

Deborah Christina Moraes Mesquita<sup>1\*</sup>, Fabricio Alves Ferreira<sup>2</sup>, Irene Martins<sup>1</sup>, Sueli Corrêa Marques Mello<sup>1</sup>, Daniel Diego Costa Carvalho<sup>2</sup>

**RESUMO:** O controle biológico tem sido pesquisado como uma alternativa para manejo do mofo branco na cultura do feijão comum. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antagônica *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. Treze isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados em laboratório por meio de testes de cultura pareada e crescimento do patógeno na presença de metabólitos voláteis e não voláteis produzidos pelo antagonista. Dentre os treze isolados de *Trichoderma* avaliados *in vitro*, o isolado CEN550 foi o que apresentou os melhores resultados nos testes com cultura pareada, metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis contra *S. sclerotiorum*, pois inibiu o crescimento do patógeno em 92%, 30% e 94%, respectivamente. O isolado CEN550 deverá ser avaliado em condições de campo.

**Palavras-chave:** controle biológico, metabólitos antifúngicos, mofo branco

## *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. to *Sclerotinia sclerotiorum* from common bean

**ABSTRACT:** The biological control has been researched as an alternative to managing white mold in common bean crop. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* antagonistic ability of *Trichoderma* spp. on *Sclerotinia sclerotiorum*. A total of thirteen isolates of the antagonist was evaluated in laboratory through paired culture and the pathogen growth was evaluated in the presence of volatile metabolites and nonvolatile metabolites produced by the antagonists. Among the thirteen isolates of *Trichoderma* evaluated *in vitro*, the isolate CEN550 showed the best results in assays with paired culture, volatile metabolites and nonvolatile metabolites against *S. sclerotiorum*, since inhibited the growth of the pathogen in 92%, 30% and 94%, respectively. The isolate CEN550 should be assessed under field conditions.

**Keywords:** biological control, antifungal metabolites, white mold

## INTRODUÇÃO

A ocorrência do mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, tem ocasionado perdas na produtividade em grãos de feijoeiro, as quais podem chegar a ser total na área plantada, quando sob condições de umidade e temperatura propícias e elevado potencial de inóculo (SHARAN & MEHTA, 2008). Neste contexto, o uso sistemático de fungicidas, mesmo reconhecendo sua eficácia, além de demandar grandes investimentos financeiros, apresenta um elevado potencial tóxico ao homem e ao meio ambiente (GUIMARÃES et al., 2014). Desta forma, a utilização de microrganismos com comprovada ação antagônica ao fungo *S. sclerotiorum*, são consideradas ações efetivas e menos danosas ao meio ambiente (MISHRA et al., 2011).

Programas que priorizem o controle biológico devem estar fundamentados na seleção de microrganismos potencialmente antagônicos em relação ao fitopatógeno alvo (MELLO et al., 2007).

Assim, há exigência de se conhecer suas características *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* permitem que alguns mecanismos de ação importantes como antibiose e hiperparasitismo sejam verificados (LIU et al., 2009; LOUZADA et al., 2009).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são oportunistas, simbioses de plantas, fortes competidores da rizosfera e constituem fontes de enzimas degradadoras de parede de outros fungos. São ainda importantes produtores de antibióticos e parasitas de fungos fitopatogênicos (KUMAR et al., 2012). A diversidade de mecanismos utilizados por esses fungos explica o interesse da ciência em estudá-los. Dentre esses mecanismos, destacam-se a produção de metabólitos e de enzimas com propriedades antifúngicas (VAN NGUYEN et al., 2008). Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antagônica *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum*.

Recebido em 05/10/2015, Aceito para publicação em 15/05/2017

<sup>1</sup> EMBRAPA CENARGEN.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Goiás (UEG)

\*e-mail: deborah.mesquita@gmail.com

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e Identificação do material botânico

Os isolados de *Trichoderma* utilizados nesse trabalho, pertencem à coleção de microrganismos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. Os isolados CEN437, CEN439, CEN440, CEN441, CEN560 e CEN660 pertencem à espécie *T. harzianum*. Os demais isolados são referidos como *Trichoderma* sp. O isolado de *S. sclerotiorum* (SS-36) foi obtido da Coleção de Fitopatógenos da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.

Os testes com cultura pareada, metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis foram realizados em conformidade com Carvalho et al. (2011). Para o teste de cultura pareada, o patógeno foi repicado um dia antes do antagonista, ambos depositados opostamente em cada placa contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, as placas foram submetidas a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações consistiram nas medições do diâmetro das colônias do patógeno com régua milimétrica aos 13 dias após repicagem dos antagonistas.

O teste com metabólitos voláteis consistiu na união de bases de placas contendo o antagonista recém colocado e o patógeno (3 dias de crescimento). As placas foram incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, de forma que as bases superiores fossem aquelas que continham o patógeno. Após cinco dias, mediu-se o diâmetro das colônias de *S. sclerotiorum*. Para o teste com metabólitos não voláteis, cinco discos (5 mm) contendo micélio de *Trichoderma* foram transferidos para frascos Erlenmeyer (500 ml), contendo 250 mL de meio batata-dextrose (BD). Após cinco dias de cultivo em agitador orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160) a 250 rpm e temperatura de 25°C, em ausência de luz, as culturas foram filtradas, com auxílio de bomba a vácuo. A parte líquida foi esterilizada por filtração (filtro Millipore 0,45µm) e cada isolado passou por três filtrações. Em seguida, cinco mililitros do filtrado de cada isolado foi acrescido a 15 ml de BDA fundente contendo ágar a 28%, em placa de Petri. Após solidificação do meio, um disco de ágar (5 mm), contendo micélio do patógeno, foi depositado sobre o meio. Para a testemunha, foi adicionado 5 ml de água destilada esterilizada ao BDA fundente. As placas foram mantidas por sete dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas até obtenção dos diâmetros das colônias do patógeno.

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com

quatro repetições para cada isolado de *Trichoderma*. Para obtenção dos valores médios de crescimento de colônias de *S. sclerotiorum* (%), considerou-se 100% de crescimento a área final ocupada pela testemunha menos a área inicial (patógeno com três dias de crescimento no teste com metabólitos voláteis).

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância, ao teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ) com auxílio do programa estatístico SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011), considerando os valores relativos a Testemunha, obtidos de colônias com cinco e sete dias de crescimento do patógeno nos testes com metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado de *Trichoderma* CEN550 apresentou os melhores resultados em relação à ação antagonista ao patógeno *S. sclerotiorum*, limitando seu crescimento a 8,2% nas placas de Petri no teste de cultura pareada, o que diferiu estatisticamente de todos os tratamentos (Tabela 1). Quanto ao teste com os metabólitos voláteis, dos treze isolados avaliados, doze apresentaram ação semelhante, limitando o crescimento do patógeno em uma faixa que foi de 60,5% até 73,2%, sendo os valores de diâmetro médio com estes isolados estatisticamente inferiores aos obtidos com a testemunha. Em relação à ação de metabólitos não voláteis, o isolado CEN550, novamente apresentou o melhor resultado, pois permitiu o crescimento do patógeno em apenas 6,2% da superfície do meio BDA na placa de Petri, diferindo estatisticamente dos demais, cujo índice de crescimento variou de 37 a 100%.

Os resultados apresentados na Tabela 1 comprovam o potencial antagonístico e inibitório do fungo *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum*. Quando em cultura pareada, os principais mecanismos que permitem a promoção competitiva de *Trichoderma* em relação a outros fungos são o hiperparasitismo e competição por espaço (FRAVEL, 2005), sendo esta última a mais visível para CEN550. Em relação a produção de metabólitos secundários voláteis, os isolados apresentaram nível de ação estatisticamente similar. A atividade antagonista sobre o patógeno se restringiu a 40%. Esses resultados estão em conformidade com Carvalho et al. (2011), em que a atividade de metabólitos voláteis de *T. harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* se restringiu a 50%. Em resultado um pouco melhor, Lopes et al. (2012) relataram 60% de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* pela ação de metabólitos voláteis de *T. harzianum* (isolado ALL-42).

Tabela 1. Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultivo pareado e efeito inibidor de metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Crescimento de colônias de <i>Sclerotinia sclerotium</i> (%) sob efeito de <i>Trichoderma</i> spp. <sup>(1)</sup>		
	Cultura pareada <sup>(2)</sup>	Metabólitos voláteis <sup>(3)</sup>	Metabólitos não voláteis <sup>(3)</sup>
CEN 550	8,2 a	69,7 a	6,2 a
CEN 597	24,7 b	68,2 a	100,0 d
CEN 654	33,0 c	64,2 a	100,0 d
CEN 660	33,0 c	73,2 a	97,2 d
CEN 436	33,0 c	61,2 a	96,5 d
CEN 439	33,0 c	60,5 a	87,0 c
CEN 608	50,0 d	66,7 a	100,0 d
CEN 647	50,0 d	63,2 a	100,0 d
CEN 440	50,0 d	63,2 a	100,0 d
CEN 437	50,0 d	86,7 b	98,0 d
CEN 441	50,0 d	76,0 a	100,0 d
CEN 595	50,0 d	69,7 a	37,0 b
CEN 560	50,0 d	70,7 a	100,0 d
Testemunha	100,0 e	100,0 c	100,0 d
Coeficiente de variação (%)	9,18	10,00	5,64

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ );

<sup>(2)</sup>Percentual de colonização;

<sup>(3)</sup>Valores relativos a Testemunha.

A ação antagonista por metabólitos não voláteis foi relativamente inferior à apresentada pela ação produzida pelos metabólitos voláteis. Entretanto, no teste com os metabólitos não voláteis, o isolado CEN550 limitou o crescimento do patógeno em apenas 6,2%. Tal resultado pode ser considerado raro, pois uma inibição do crescimento micelial em testes *in vitro* com metabólitos não voláteis da ordem de 94%, não tem sido obtida por alguns autores (CARVALHO et al., 2011; LOPES et al., 2012; CARVALHO et al., 2014). A combinação entre a produção de metabólitos (seja voláteis ou não voláteis) e o parasitismo apresentado por algumas linhagens de *Trichoderma* vem recebendo grande atenção, uma vez que se comprova a versatilidade da ação inibitória em relação a fitopatógenos (EZZIYANI et al., 2007). Enzimas produzidas por *Trichoderma* degradam as paredes celulares de outros fungos e a esse efeito se soma a ação tóxica de substâncias antifúngicas produzidas pelo antagonista, reduzindo ou mesmo paralisando (efeito fungistático) o crescimento e a esporulação do patógeno. Esse efeito pode também se expressar pela redução da germinação de esporos e distorções nas hifas e endólise das mesmas, minimizando a expressão do fitopatógeno (BOMFIM et al., 2010). Aparentemente, o efeito dos metabólitos não voláteis sobre *S. sclerotiorum* possui caráter mais fungicida do que fungistático, enquanto que para o caso de metabólitos voláteis, sugere-se o inverso. Tais características conferem vantagens para sobrevivência dos fungos do gênero *Trichoderma*, ampliando a diversidade de estratégias competitivas no ambiente (RESENDE et al., 2004).

Uma potencial aplicabilidade dos metabólitos não voláteis seria no controle de patógenos habitantes do

solo, pois tais metabólitos possuem capacidade para difusão no solo, quando solúveis em água (LOBO JUNIOR & ABREU, 2000), o que credita o isolado CEN550 para controle de *S. sclerotiorum* também no solo. Adicionalmente, o fungo *Trichoderma* é recomendado para o biocontrole de fitopatógenos radiculares, em muitos casos resistentes a fungicidas (COLLA et al., 2008). Para finalizar é importante ressaltar que a capacidade de produção de metabólitos tóxicos com efeito fungicida ou fungistático deve ser considerada de maneira associada, de modo a se obter melhor efetividade para controle em condições de campo (KAEWCHAI et al., 2009).

## CONCLUSÕES

Dos 13 isolados de *Trichoderma* spp. utilizados para a realização dos ensaios comparativos, o isolado CEN550 foi o que apresentou melhor desempenho, sendo indicado para realização de testes no campo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e à FAP-DF pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOMFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N. O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, p.61-67, 2010.

- CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v.39, p.384-391, 2014.
- CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v.36, p.28-34, 2011.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, p.809-813, 2008.
- EZZIYYANI, M.; REQUNENA, M. E.; EGEGILABERT, C.; CANDEL, M. E. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v.155, p.342-349, 2007.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, p.1039-1042, 2011.
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.337-359, 2005.
- GUIMARÃES, G. R.; PEREIRA, F. S.; MATOS, F. S.; MELLO, S. C. M.; CARVALHO, D. D. C. Suppression of seed borne *Cladosporium herbarum* on common bean seed by *Trichoderma harzianum* and promotion of seedling development. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v.39, p.401-406, 2014.
- KAEWCHAI, S.; SOYTONG, K.; HYDE, K. D. Mycofungicides and fungal biofertilizers. **Fungal Diversity**, New York, v.38, p.25-50, 2009.
- KUMAR, D. P.; THENMOZHI, R.; ANUPAMA, P. D.; NAGASATHYA, A.; THAJUDDIN, N.; PANEERSELVAM, A. Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, Alberta, v.2, p.78-89, 2012.
- LIU, L. N.; ZHANG, J. Z.; XU, T. Histopathological studies of sclerotia of *Rhizoctonia solani* parasitized by the EGFP transformant of *Trichoderma virens*. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v.49, p.745-750, 2009.
- LOBO JÚNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.521-526, 2000.
- LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; GERALDINE, A. M.; BRANDAO, R. S.; MONTEIRO, V. N.; LOBO JUNIOR, M.; COELHO, A. S. G.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, Oxford, v.116, p.815-824, 2012.
- LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v.9, n.3, p.145-149, 2009.
- 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 rolfsi* Sacc. **Fitosanidad**, Havana, v.11, p.1-11, 2007.
- MISHRA, D. S.; GUPTA, A. K.; PRAJAPATI, C. R.; SINGH, U. S. Combination of fungal and bacterial antagonists for management of root and stem rot disease of soybean. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.43, p.2569-2574, 2011.
- RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; PINHO, R. G. V.; VIEIRA, A. R. Inoculações de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, p.793-798, 2004.
- SAHRAN, G. S.; MEHTA, N. **Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management**. New Delhi: Springer, 2008. 481p.
- VAN NGUYEN, N.; KIM, Y. J.; OH, K. T.; JUNG, W. J.; PARK, R. D. Antifungal activity of chitinases from *Trichoderma aureoviride* DY-59 and *Rhizopus microsporus* VS-9. **Current Microbiology**, New York, v.56, p.28-32, 2008.