

Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* in vitro

Evaluation of the antagonistic of Trichoderma against Sclerotinia sclerotiorum and Sclerotium rolfsii by the method of culture paired in vitro

SANTOS, Débora Brito dos¹; MARQUES, Eder²; SILVA, João Batista Tavares³; MARTINS, Irene⁴; MELLO, Sueli Corrêa Marques de⁵

1 UDF- Centro Universitário do DF, de_deusehmais@yahoo.com.br; 2 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- CENARGEN, eder.marques.08@gmail.com; 3 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- CENARGEN, joao.tavares@embrapa.br; 4 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- CENARGEN, irene.martins@embrapa.br; 5 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- CENARGEN, sueli.mello@embrapa.br

Resumo

Os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* são fitopatógenos causadores de doenças agrícolas que provocam grandes perdas na produção e na qualidade dos produtos finais. Diversos microrganismos vêm sendo avaliados como agentes de biocontrole para essas doenças, dentre eles citam-se fungos do gênero *Trichoderma*. Com o objetivo de avaliar a capacidade de inibição do crescimento micelial dos patógenos por *Trichoderma* foi utilizada a técnica de pareamento de culturas. Vinte e dois isolados do antagonista foram utilizados contra cada um dos patógenos. Os resultados demonstraram boa capacidade inibitória dos isolados de *Trichoderma* destacando-se os isolados CEN1289, CEN1275 e CEN1277. Estudos *in vivo* serão conduzidos visando ao aproveitamento dos potenciais agentes de biocontrole para gerar novos bioprodutos para uso agrícola. Isolados com esse potencial serão incorporados à Coleção de Microorganismos para o Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa.

Palavras-chave: pareamento de culturas; inibição do crescimento micelial de patógenos; controle biológico.

Abstract

The phytopathogenic fungi *S. sclerotiorum* and *S. rolfsii* cause disease responsible for severe losses in yield and quality of agricultural products. Many microorganisms have been evaluated as biocontrol agents for these diseases. Among them we mention fungi of the genus *Trichoderma*. This work was conducted in order to evaluate the ability of *Trichoderma* isolates for inhibiting the mycelial growth of the pathogens using the dual culture. Twenty-two isolates of the antagonist fungus were used against each pathogen. The results demonstrated the good performance of the isolates, highlighting CEN1289, CEN1275 and CEN1277. Other tests, *in vivo*, will be conducted for harnessing the potential of these biocontrol agents to generate new bioproducts for agricultural use. Isolates exhibiting this potential will be incorporated into the Collection of Microorganisms for Biological Control of Weeds Phytopathogen and Embrapa.

Keywords: pairing cultures; inhibition of mycelial growth of pathogens; biological control.

Introdução

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (*S.s*), causador do mofo branco, é um dos patógenos mais agressivos (Bolton *et al.*, 2006), capaz de infectar cerca de 408 espécies de plantas, envolvendo 278 gêneros em 48 famílias botânicas (Boland e Hall, 1994), abrangendo desde culturas de alto potencial econômico a plantas daninhas. Esse patógeno encontra-se disseminado mundialmente, não só pelo amplo ciclo de hospedeiros, mas, principalmente, pela capacidade de se manter no solo por períodos prolongados (até 11 anos), em forma de esclerócios, que são estruturas de resistência do fungo (Leite, 2005).

Sclerotium rolfsii (*S.r*), por sua vez, causa murchas, tombamento, podridão de raízes e escurecimento da região do colo da planta (Macedo, 2007). É também capaz de infectar uma extensa gama de hospedeiros, em cerca de 500 espécies botânicas, incluindo espécies hortícolas,

ornamentais, leguminosas, cereais forrageiras e daninhas (Akram *et al.*, 2008). A doença distribuiu-se por todas as regiões agrícolas, com predominância nas zonas tropical e subtropical, onde predominam condições de alta umidade e temperatura, com o seu desenvolvimento ótimo na faixa de 27-30 °C (Aycock, 1966; Punja, 1985). Seus esclerócios, como no caso anterior, confere a esse fungo grande capacidade de sobrevivência no ambiente.

Entre os antagonistas mais utilizados contra os patógenos do solo, de maneira geral, citam-se os fungos do gênero *Trichoderma*, que vêm sendo amplamente estudados como agentes de biocontrole de doenças de plantas (Castillo *et al.*, 2011). Estes ocorrem em quase todos os tipos de solo, nos mais diversos ecossistemas, sendo principalmente saprófitos. Podem estar presentes na região de influência das raízes e/ou no rizoplane, além de colonizar internamente os tecidos vegetais. Dentre seus mecanismos de ação inibidora são citados como mais importantes a competição, o parasitismo direto e a antibiose mediada pela produção de metabólitos secundários com propriedades antibióticas e enzimas hidrolíticas (Melo, 1998; Benitez *et al.*, 2004). Esses fungos também atuam, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, como indutores de resistência de plantas a doenças e como promotores de crescimento vegetal, além de contribuir para melhor poder germinativo de sementes (Harman, 2011).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* de inibir o crescimento micelial desses dois patógenos, *S. sclerotium* e *S. rolfsii*, com vistas à seleção de potenciais agentes de biocontrole.

Metodologia

Foram selecionados 22 isolados de cultivos monospóricos de *Trichoderma* provenientes de solo e rizosfera de lavouras orgânicas e plantas nativas de Cerrado do Distrito Federal (Tabela 1).

Os isolados *S. sclerotium* e *S. rolfsii* testados pertencem à Coleção de Microorganismos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra os fitopatógenos foi avaliado em confronto direto, utilizando o método de culturas pareadas, de acordo com DENNIS & WEBSTER (1971). A multiplicação inicial dos fungos ocorreu em placas de Petri com meio BDA à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas em câmara incubadora do tipo B.O.D. (marca Fanen, mod. 347) por um período de 5 a 7 dias.

Discos de ágar (5 mm de diâmetro) contendo as estruturas fúngicas retirados dessas culturas foram transferidas para novas placas contendo o mesmo meio. Em cada placa foram depositados, em lados diametralmente opostos, disco do antagonista e do patógeno. Em seguida, as culturas foram incubadas nas mesmas condições descritas. Como controle, foram preparadas placas de BDA contendo somente o patógeno. Para cada isolado de *Trichoderma* foram realizadas três repetições, distribuídas inteiramente ao acaso na BOD. As avaliações foram realizadas entre o quinto e sétimo dia de cultivo, de acordo com o crescimento do controle ocupando toda a placa. Cada pareamento foi realizado duas vezes para ambos os patógenos.

Para calcular o percentual de inibição do crescimento micelial (ICM), mediu-se com uma régua a superfície do meio colonizada pelo patógeno, aplicando-se então a seguinte fórmula: $ICM = [(9 -$

$x) \div 9 \times (100)]$, em que 9 é a medida, em cm, do crescimento micelial da testemunha, que ocupou toda a superfície do meio e x representa o crescimento micelial, em cm, do patógeno em cada repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de comparação de médias (Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), utilizando o software Assistat 7.7.

Resultados e Discussão

Nos pareados com *S.s.* os índices de inibição variaram entre 55,55 e 87,77%. Nestes, houve a formação de dois grupos de inibição: grupo A, formado por sete isolados (CEN1292, CEN1289, CEN1275, CEN1277, CEN1276, CEN1287 e CEN1285) e grupo B, no qual se enquadram os 15 demais isolados (CEN 1294, CEN1290, CEN1280, CEN1291, CEN1283, CEN1295, CEN1279, CEN1282, CEN1296, CEN1281, CEN1286, CEN1284, CEN1293, CEN1288 e CEN1278). Também nos pareados com *S.r.* houve a formação de dois grupos, com variação de 65,92 a 86,29 no ICM. No grupo A, foram distribuídos sete isolados (CEN1289, CEN 1275, CEN1277, CEN1291, CEN1295, CEN1282 e CEN1278) e 15 no grupo B (CEN1294, CEN1292, CEN1290, CEN1280, CEN1283, CEN1279, CEN1276, CEN1287, CEN1296, CEN1281, CEN1286, CEN1284, CEN1293, CEN1288 e CEN1285).

Todos os isolados de *Trichoderma* possuem ação inibitória do crescimento micelial (ICM) de ambos antagonistas. Resultado semelhante foi obtido por Bonfim (2007), onde todos os isolados de *Trichoderma* testados apresentaram rápido crescimento micelial, diferindo estatisticamente da testemunha ao inibir o desenvolvimento de *Rhizopus stolonifer* de maracujazeiro. Já Carvalho Filho *et al.* (2008), demonstraram o potencial dos isolados de *Trichoderma*, para controle de *Cylindrocladium*.

Os isolados CEN1289, CEN1275 e CEN1277 foram os que apresentaram maiores valores de ICM para ambos os patógenos.

A capacidade de inibição dos isolados de *Trichoderma* possibilita a seleção de agentes de biocontrole contra os patógenos. A princípio, esses isolados demonstram ter grande potencial *in vitro*, entretanto, são necessários testes em casa de vegetação e campo para confirmar esse potencial de controle.

Conclusões

Todos os isolados de *Trichoderma* exercem ação inibitória contra os antagonistas testados. Os isolados CEN1289, CEN1275 e CEN1277 foram os que apresentaram melhor potencial para serem utilizados como agentes de controle biológico dos patógenos *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.

Referências bibliográficas

- AKRAM, A.; IQBAL, S. M.; QURESHI, R. A.; RAUF, C. A. Variability among isolates of *Sclerotium rolfsii* associated with collar rot disease of chickpea in Pakistan. **Pakistan Journal Botanic**, Islamabad, v. 40, n. 1, p. 453-460, janeiro, 2008.
- AYCOCK, R. **Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii***. North Caroline: Agricultural Experiment Station Tech. Bull, 1966. p. 174.

- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; M., LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona, v. 7, n. 4, p. 249-260, dezembro, 2004.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plants of hostes *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, janeiro, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, Lancaster. v. 7, n.1, p. 1-16, janeiro, 2006.
- BONFIM, M. P. Antagonismo in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. 76 f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Vitória da Conquista - BA, 2007.
- CARVALHO FILHO, M. R. **Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro.** Brasília: UNB, 2013. 111 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Programa de Pós- Graduação em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2013.
- CARVALHO FILHO, M. R.; MENÉZES, J. E.; MELO, S. C. M; SANTOS, R. P. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do Eucalipto in vitro e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- CASTILLO, F. D. H.; PADILLA, A. M. B.; MORALES, G. G.; SILLER, M. C.; HERRERA, R. R.; GONZALES, C. N. A.; REYES, F. C. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, Coahuila, v. 6, n. 3, p.410-417, agosto, 2011.
- DENNIS C., WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, n. 3, p. 363-369, dezembro, 1971.
- HARMAN G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, New York, v. 190, n. 3, p 647- 649, fevereiro, 2011.
- MACEDO M. A, MARTINS, I., DELGADO, G.V., MELLO, S.C.M. MENÉZES, J.E. **Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *Sclerotium rolfsii*.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
- MELO I. S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos.** In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p.17-66.
- MONTALVÃO, S. C. L. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro.** Brasília: UNB, 2012. 105 f. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2012.
- PUNJA Z. K, UTKHEDE R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends Biotechnol**, British Columbia, v. 21, n. 9 p. 400-407, setembro, 2003.
- PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, California, v. 23, p. 97-127, setembro, 1985.

Tabela 1. Descrição dos isolados de *Trichoderma*, valores médios do percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* nos testes de cultivo pareado e desvio padrão (DP) de cada média.

Isolado	Substrato	Planta	ICM S. s	DP das médias de S. s	ICM S. r	DP das médias de S. r.
CEN1294	Rizosfera	Maminha de Porca	60,00 b*	-10,25	72,22 b	-2,47
CEN1292	Rizosfera	Cebolinha	87,77 a	17,52	75,18 b	0,49
CEN1289	Rizosfera	Rubiácea	83,33 a	13,08	77,40 a	2,71
CEN1290	Rizosfera	Rubiácea	64,44 b	-5,81	74,81 b	0,12
CEN1275	Solo	Mucuna	80,74 a	10,49	87,03 a	12,34
CEN1277	Solo	Salsa	86,29 a	16,04	79,62 a	4,93
CEN1280	Rizosfera	Berinjela	70,37 b	0,12	74,44 b	-0,25
CEN1291	Rizosfera	Rubiácea	70,74 b	0,49	78,88 a	4,19
CEN1283	Solo	Margaridão	55,55 b	-14,7	73,70 b	-0,99
CEN1295	Rizosfera	Maminha de Porca	62,59 b	-7,66	86,29 a	11,6
CEN1279	Rizosfera	Berinjela	62,96 b	-7,29	68,14 b	-6,55
CEN1276	Rizosfera	Couve	80,74 a	10,49	72,22 b	-2,47
CEN1287	Rizosfera	Rubiácea	78,51 a	8,26	65,92 b	-8,77
CEN1282	Rizosfera	Espinafre	58,51 b	-11,74	81,85 a	7,16
CEN1296	Solo	Espinafre	67,77 b	-2,48	71,85 b	-2,84
CEN1281	Solo	Milho	63,70 b	-6,55	73,70 b	-0,99
CEN1286	Solo	Margaridão	70,37 b	0,12	72,22 b	-2,47
CEN1284	Solo	Margaridão	60,74 b	-9,51	67,77 b	-6,92
CEN 1293	Rizosfera	Rubiácea	64,07 b	-6,18	70,00 b	-4,69
CEN1288	Solo	Rubiácea	72,96 b	2,71	67,40 b	-7,29
CEN1278	Rizosfera	Berinjela	60,37 b	-9,88	78,14 a	3,45
CEN1285	Rizosfera	Margaridão	82,96 a	12,71	74,44 b	-0,25
Média Geral			70,25		74,69	
Coefficiente de variação			16,79		9,02	

*Médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).