



ARTIGO

## Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp.

Omari Dangelo Forlin Dildey<sup>1\*</sup>, Jaqueline Maisa Barbian<sup>2</sup>, Edilaine Della Velentina Gonçalves<sup>1</sup>,  
Laline Broetto<sup>1</sup>, Luciana Zago Ethur<sup>3</sup>, Odair José Kuhn<sup>4</sup> e Lucimar Pereira Bonett<sup>5</sup>

Recebido: 28 de agosto de 2013    Recebido após revisão: 5 de agosto de 2014    Aceito: 8 de setembro de 2014

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2747>

**RESUMO:** (Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp.). *Sclerotinia sclerotiorum* é um patógeno que causa danos em muitas plantas de interesse econômico, sendo responsável pela podridão de raízes e colo, murcha e tombamento de plântulas, conhecido como mofo branco. *Trichoderma* spp. estão entre os fungos mais pesquisados atualmente, como agente de biocontrole, sendo antagonistas a vários fitopatógenos em diferentes culturas. O trabalho teve como objetivo verificar a capacidade de isolados de *Trichoderma* quanto à eficiência na inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*. Para o experimento foram utilizados oito isolados de *Trichoderma* spp. e um isolado de *S. sclerotiorum*, obtido de cultura do tomate. A verificação da inibição dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o fitopatógeno foi realizada utilizando-se a metodologia de confrontação direta, com uma escala de notas que variam de um a sete e a medida do diâmetro das colônias para a metodologia de produção de metabólitos voláteis. O delineamento foi inteiramente casualizado com dez repetições. A maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. mostraram relativa eficiência na inibição de *S. sclerotiorum*, porém os isolados TM1 e TI4 apresentaram maior agressividade considerando a confrontação direta e produção de metabólitos voláteis.

**Palavras-chave:** antagonismo, controle biológico, crescimento micelial, *Trichoderma*.

**ABSTRACT:** (*In vitro* growth inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*, white mould causal agent, by *Trichoderma* spp. isolates). *Sclerotinia sclerotiorum* is a fungal pathogen that causes damages to many plants of economic interest, being responsible for root and stem rot, seedling wilt and damping-off, known as white mold. *Trichoderma* spp. are among the most studied fungi as biocontrol agents, being antagonistic to various phytopathogens in different cultures. This study aimed to verify the ability of *Trichoderma* spp. isolates as the efficiency in inhibiting the growth of *S. sclerotiorum*, the white mould causal agent. For the experiment, eight *Trichoderma* spp. isolates and one *S. sclerotiorum* isolate were used, obtained from tomato crop. The inhibition examination of *Trichoderma* spp. against the phytopathogen was performed by using the methodology of direct confrontation, with a scale ranging from one to seven and the measurement of the colonies diameter for the volatile metabolites production methodology. The design was completely randomized with ten repetitions. Most of *Trichoderma* isolates showed relative efficiency on the *S. sclerotiorum* inhibition; however the TM1 and TI4 showed more aggressiveness considering the direct confrontation and volatile metabolites production.

**Key words:** antagonism, biological control, mycelial growth, *Trichoderma*.

### INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* é um fitopatógeno fúngico que causa danos em muitas plantas de interesse econômico, sendo que Leite (2005) destacou 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies, onde entre eles destacam-se a soja, girassol, canola, ervilha, feijão, alfafa, fumo, tomate e batata. É um importante fitopatógeno habitante do solo, sendo responsável por podridão de raízes e do colo, murcha e tombamento de plântulas (Bedendo 1995). Segundo Cardoso (1990), *S. sclerotiorum* causa uma doença conhecida como mofo branco, cujos sintomas se caracterizam pela podridão úmida coberta por um micélio de cor branca na superfície do solo e/ou tecido

hospedeiro, produzindo eventualmente estruturas de resistência denominadas escleródios.

A incidência do mofo branco é favorecida pela alta densidade de plantio, períodos prolongados de precipitação, elevada umidade do ar e temperaturas amenas (Ethur 2005). Nessas condições, a doença é difícil de ser controlada, podendo atacar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento, principalmente próximo à colheita (Pavan 1997). Assim, atenção tem sido voltada para a utilização de métodos alternativos aos fungicidas tradicionais, que sejam eficientes com mínimo de impacto ambiental e perigo aos consumidores (Schwan-Estrada *et al.* 2003).

1. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Rua Pernambuco, 1777, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil.

2. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agroindustrial pela Universidade Paranaense (UNIPAR). Avenida Parigot de Souza, 3636, Jardim Prada, CEP 85903-170, Toledo, PR, Brasil.

3. Professora Dra. da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA). Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n, Bairro Promorar, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brasil.

4. Professor Dr. do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA). Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil.

5. Professora Dra. da Universidade Paranaense (UNIPAR). Avenida Parigot de Souza, 3636, Jardim Prada, CEP 85903-170, Toledo, PR, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: [omaridildey@hotmail.com](mailto:omaridildey@hotmail.com)

O gênero *Trichoderma* Pers. é um dos mais pesquisados na atualidade como agente de biocontrole, sendo antagonista a vários fitopatógenos em diferentes culturas (Ethur 2006). Pertence a classe Ascomycota, que produz abundantes conídios, a partir de células conidiogênicas, originando estruturas denominadas conidióforos, emergindo diretamente das hifas. Em seu estado telemórfico, quando conhecido, pertence à ordem Hypocreales (Melo 1998; Poletto 2010).

Os fungos desse gênero são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doença (Louzada *et al.* 2009). Os produtos a base de *Trichoderma* têm uma boa eficiência e são de fácil aplicação, pois podem ser aplicados na água da irrigação ou inoculados nas sementes, e o custo é aproximadamente um terço do custo dos fungicidas (Morandi *et al.* 2005).

Estudos relacionados ao controle biológico de *S. sclerotiorum* têm focado principalmente na degradação dos escleródios. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. quanto à eficiência na inibição do crescimento da *S. sclerotiorum* causador do mofo branco.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção de isolados de *Trichoderma* spp.

Para os ensaios utilizou-se isolados de *Trichoderma* spp. identificados como TI1, TI2, TI3, TI4, oriundos de solo de mata do município de Itaqui e TM1, TM2, TM3 e TM4 do município de Maçambará do estado do Rio Grande do Sul, cultivados no laboratório de fitopatologia da Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui. A manutenção dos isolados foi realizada por repicagens sucessivas em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

### Isolamento de *Sclerotinia sclerotiorum*

O patógeno de solo *Sclerotinia sclerotiorum* foi isolado de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) que apresentavam sintomas típicos de podridão de raiz e lesão na região do colo. O isolamento foi realizado através de estruturas de resistência fúngicas (escleródios), obtidos do interior de caule e raiz de plantas de tomateiro contaminadas. As estruturas foram desinfetadas superficialmente com álcool 70% (um minuto), em seguida imersas em hipoclorito de sódio 3% (um minuto) e lavadas por três vezes com água destilada autoclavada, então transferidas para a placa de Petri contendo cerca de 20 mL de meio BDA. As placas foram incubadas em câmara escura a 25 °C para obtenção de culturas puras. Depois de isolado o fungo, a manutenção da cultura foi realizada por repicagens sucessivas em meio BDA.

### Técnica de Confrontação Direta

Para a seleção de isolados de *Trichoderma* antagonistas ao *S. sclerotiorum*, realizou-se o teste de confrontação direta de culturas. Para isso, os discos com 0,5 cm de diâ-

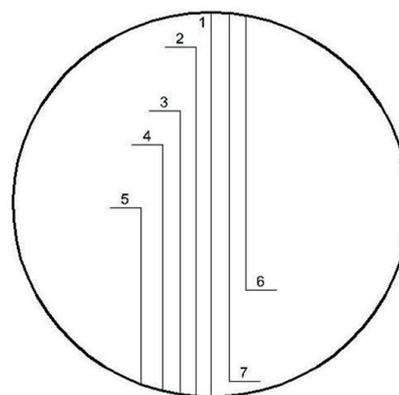
metro de meio BDA contendo micélio de *S. sclerotiorum* foram retirados de colônias com quatro dias de cultivo e depositados a uma distância de 1,0 cm da borda da placa de Petri, contendo cerca de 20 mL de meio BDA. Como testemunhas, foram utilizadas placas repicadas unicamente com *S. sclerotiorum*. As placas foram incubadas por 24 horas em câmara escura, a 25 °C. Esse procedimento foi realizado pelo fato que o tempo de crescimento do patógeno é mais lento do que o tempo de crescimento do antagonista. Após esse período, foi colocado um disco com 0,5 cm de diâmetro de meio BDA, contendo micélio de *Trichoderma* spp. na extremidade oposta da placa de Petri (Ethur 2006). As placas foram incubadas em câmara de crescimento escura, a uma temperatura de 25 °C por um período de sete dias.

Os dados foram coletados no sétimo dia após a implantação do experimento, período em que as placas da testemunha apresentavam-se totalmente colonizadas. Para avaliação da técnica de confrontação direta utilizou-se o modelo de notas proposto por Bell *et al.* (1982), modificada por Rodrigues (2010), atribuindo notas que variam de um a sete. De acordo com a escala, os isolados foram classificados como: nota 1, antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno; nota 2, antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não se sobrepõe ao disco do patógeno; nota 3, antagonista cresce sobre 3/4 da placa de Petri; nota 4, antagonista cresce sobre 2/3 da placa de Petri; nota 5, antagonista e patógeno crescem até a metade da placa de Petri; nota 6, patógeno cresce sobre 2/3 da placa de Petri; nota 7, patógeno cresce por toda a placa de Petri.

No momento da avaliação, quando as notas foram atribuídas, buscando uma melhor uniformidade nas avaliações, foi utilizado um gabarito sob o fundo das placas, em que era possível visualizar as notas conforme o crescimento das colônias (Fig. 1).

### Técnica de detecção de metabólitos voláteis

No teste de detecção de metabólitos voláteis (Mariano, 1993, Lobo Junior & Abreu 2000), realizou-se o crescimento do fitopatógenos em contato com gases produzidos



**Figura 1.** Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de confrontação direta de cultura. Fonte: Rodrigues (2010).

por antagonistas, comparando-se com a testemunha. Os discos de meio BDA (0,5 cm de diâmetro) contendo micélio de *S. sclerotiorum* foram retirados de colônias com quatro dias de cultivo e depositados no centro da placa de Petri, contendo cerca de 20 mL de meio BDA com pH 7,0 ajustado. Como testemunhas, foram utilizadas placas repicadas unicamente com *S. sclerotiorum*. As placas foram incubadas por 24 horas em câmara escura, a 25 °C. Esse procedimento foi realizado pelo fato de que, o tempo de crescimento do fitopatógeno é mais lento do que o tempo de crescimento do antagonista. Após esse período, foram colocados discos de meio BDA (0,5 cm de diâmetro) contendo micélio de *Trichoderma* spp. no centro da placa de Petri.

Sob condição de assepsia em câmara de fluxo laminar, as placas foram fechadas sobrepondo-se outra placa de igual diâmetro, sendo vedadas com plástico filme. Dessa maneira, o disco do antagonista com micélio e esporos ficou voltado para parte inferior e o disco do fitopatógeno com micélios e esporos voltado para parte superior, ambos cresceram sob a mesma atmosfera. Posteriormente os conjuntos de placas foram levados câmara de crescimento escura, a temperatura de 25 °C por um período de seis dias. Para avaliação da detecção de metabólitos voláteis foi realizada a medição dos tratamentos comparados com o diâmetro das colônias do fitopatógeno que cresceram na ausência do antagonista, mas presente na mesma atmosfera, sendo avaliadas a cada 48 horas após o início da repicagem (48 horas, 96 horas e 144 horas).

#### Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos e dez repetições para o teste de confrontação direta de culturas e nove tratamentos e cinco repetições para o teste de detecção de metabólitos

voláteis. Ambos, com oitos isolados de *Trichoderma* spp. ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*, mais a testemunha, as médias submetidas ao teste de comparação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para estas análises utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira 2010).

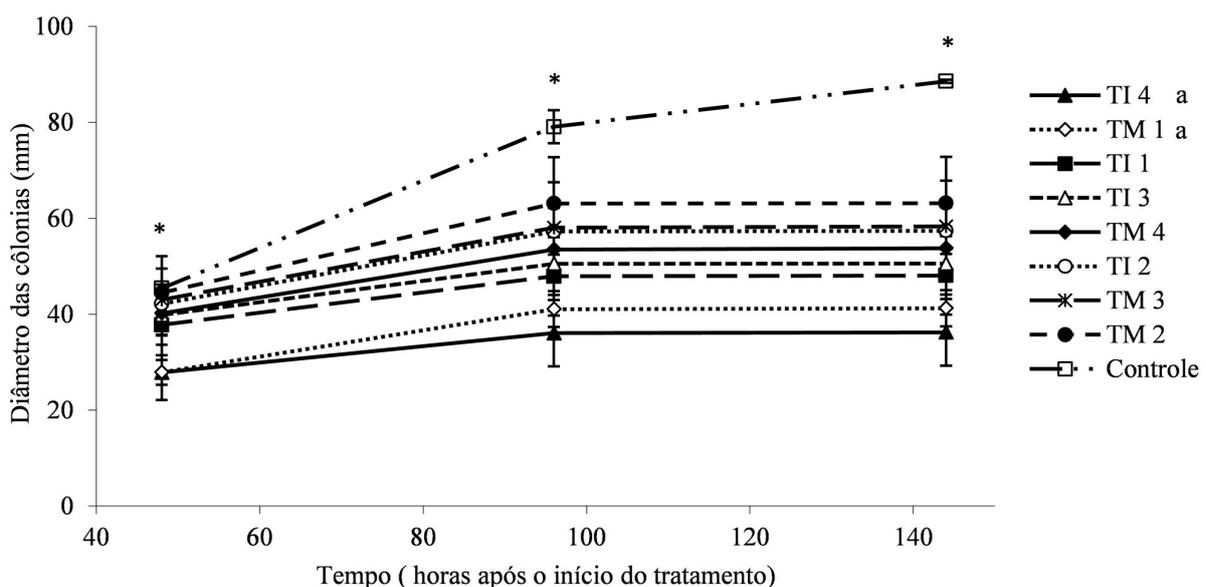
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Técnica de Confrontação Direta

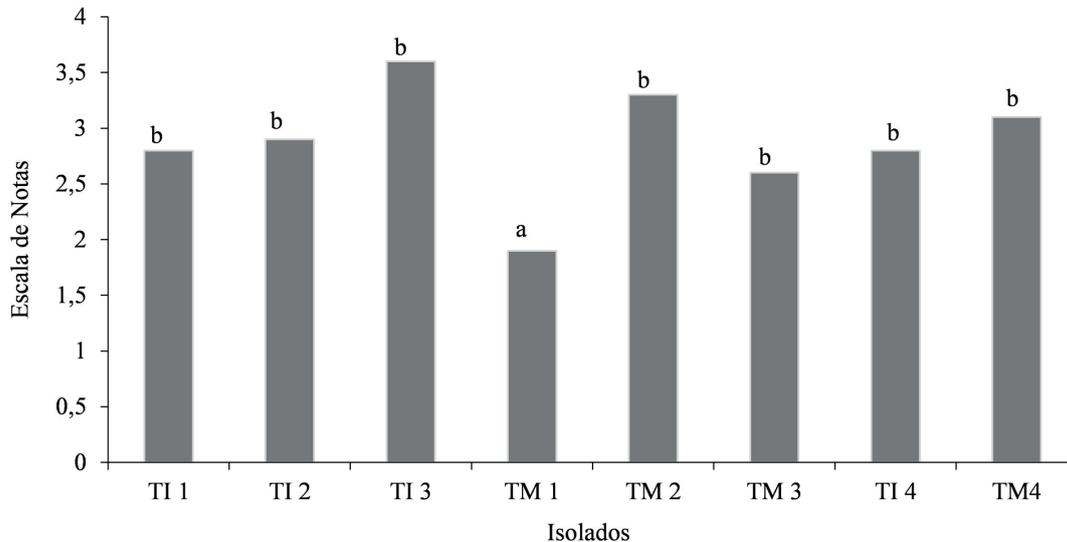
Os valores das notas obtidas pela análise de variância para os isolados de *Trichoderma* spp., são apresentados na figura 2, sendo observado efeito significativo na supressão de *S. sclerotiorum* pelo teste de comparação de médias. Os isolados foram agrupados em dois diferentes grupos pelo teste de médias. O isolado TM1 apresentou a menor nota de 1,9 crescendo por toda a placa de Petri, porém não se sobrepôs sobre o disco do fitopatógeno, diferindo significativamente dos demais, assim, sendo considerado o isolado de maior eficiência na supressão de *S. sclerotiorum*, impedindo quase que totalmente o desenvolvimento do fitopatógeno. Em seguida, o segundo grupo composto pelo restante dos isolados TI1, TI2, TI3, TM2, TM3, TI4 e TM4, os quais apresentaram médias de notas entre 2,7 e 3,6, crescendo até sobre 3/4 da placa de Petri, indicando inibição inferior à apresentada pelo isolado TM1, mesmo assim, esses isolados podem ser considerados eficientes na supressão de *S. sclerotiorum*.

Ethur (2006) observou que a seleção de isolados de *Trichoderma* spp. pela técnica de confrontação direta, pode classificar como “eficientes” aqueles que apresentam notas de 2,0 a 2,5 e “muito eficientes” aqueles com notas de 1,0 a 1,5.

A utilização da técnica de confrontação direta de cultura é efetiva para o antagonista *Trichoderma* spp.



**Figura 2.** Médias de notas atribuídas pela técnica de confrontação direta aos isolados de *Trichoderma* spp., quanto à inibição de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* causador do mofo branco em tomateiro. Médias seguidas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância.



**Figura 3.** Média de diâmetro do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em função do efeito de metabólitos voláteis produzidos pelos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. (48 horas, 96 horas, 144 horas). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão; (a) indica a diferença significativa em relação ao controle.

sobre o fitopatógeno *S. sclerotiorum* sendo demonstrada anteriormente por Melo (1998) e Delgado *et al.* (2007), onde a ação de *Trichoderma* se dá através da associação ou não dos mecanismos de parasitismo, antibiose e competição. A capacidade de produção de antibióticos pelos antagonistas pode interferir no desenvolvimento direto do fitopatógeno, bem como a competição destes por espaço e nutrientes. Além do parasitismo direto, outros mecanismos podem estar envolvidos na ação antagonista de fungos do gênero *Trichoderma* (Louzada *et al.* 2009).

Os métodos aplicados para seleção de antagonistas de *Trichoderma* spp., *in vitro*, além de serem práticos, servem como uma seleção preliminar para avaliar o potencial antagonista, e também para indicar o comportamento desses microrganismos, com relação à sua capacidade de adaptação, crescimento e reprodução (Poletto 2010).

#### Técnica de detecção de Metabólitos Voláteis

A variabilidade entre os isolados de *Trichoderma* é evidente, pois todos produzem compostos voláteis em quantidades diferentes, compostos estes que interferem significativamente no crescimento de *S. sclerotiorum*, demonstrando o potencial antagonista dos isolados.

Dos oito isolados de *Trichoderma* testados, TM1 e TI4 foram considerados com maior eficiência na inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*, enquanto os isolados TM2 e TM3 tiveram menor eficiência na inibição do fitopatógeno por esse mecanismo de antagonismo (Fig. 3).

Em trabalhos semelhantes ao desenvolvimento neste estudo, Ethur (2005) testou 73 isolados de *Trichoderma*, sendo que apenas oito (11 %) não apresentaram qualquer inibição no crescimento micelial do fitopatógeno. Os demais isolados (89%) apresentaram variabilidade evidente no controle de inibição micelial de *S. sclerotiorum*.

A eficácia de isolados de *Trichoderma* com relação ao fitopatógeno *S. sclerotiorum* na técnica para detecção de

metabólitos voláteis foi demonstrada também por Lobo Junior & Abreu (2000). Os autores observaram que isolados de *Trichoderma* spp. tiveram a capacidade de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno, demonstrando assim, a produção de metabólitos voláteis que foram prejudiciais ao crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

Metabólitos voláteis têm várias vantagens na capacidade de difusão em interstícios (separação de moléculas), assim como na solução do solo, quando solúveis em água, são somente sujeitos à adsorção e biodegradação, e seu efeito é limitado por diluição (Lobo Junior & Abreu 2000). A natureza volátil de certos antibióticos, como as pironas, produzidos por *T. harzianum* e por *T. koningii*, conferem uma vantagem distinta, já que sua ação pode atingir microrganismos fisicamente distantes dos sítios de produção, onde a permeação por inibidores pode ser altamente restrita, especialmente para metabólitos de baixa solubilidade em água (Simon *et al.* 1988).

A interferência no crescimento microbiano pode também ser comparada pela agressividade de produção de metabólitos não voláteis, qual não foi testada para os isolados selecionados para o experimento, podendo possuir agressividade inibitória e competitiva na rizosfera e no meio de crescimento do fitopatógeno.

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. mostraram relativa eficiência na inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* causador de mofo branco em tomateiro, sendo que os isolados TM1 e TI4 foram os que tiveram maior agressividade considerando a confrontação direta e a produção de metabólitos voláteis.

#### REFERÊNCIAS

- BEDENDO, I. P. 1995. Damping off. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H. & AMORIM, L. (Eds.). *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 820-828.
- BELL, D. K., WELLS, H. D. & MARKHAM, C. R. 1982. *In vitro* an-

- tagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4): 379-383.
- CARDOSO, J. E. 1990. Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo. *Embrapa Arroz e Feijão*, 30.
- DELGADO, G.V., MARTINS, I., MENÉZES, J. E., MACEDO, M. A. & MELLO, S. C. M. 2007. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro*. In: Boletim de pesquisa e desenvolvimento. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília: 214.
- ETHUR, L. Z., BLUME, E., MUNIZ, M., DA SILVA, A. C. F., STEFANELLO, D. R. & DA ROCHA, E. K. 2005. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia Brasileira*, 30(2): 127-133.
- ETHUR, L. Z. 2006. *Dinâmica populacional e ação de Trichoderma no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro*. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- FERREIRA, D.F. 2010. *SISVAR: Sistema de análise de variância*. Universidade Federal de Lavras, (CD-ROM).
- LEITE, R. M. V. B. de C. 2005. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. *Embrapa Soja*, 76.
- LOBO JUNIOR, M. & ABREU, M. S. de. 2000. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas. *Ciências Agrotécnicas*, 24(2): 521-526.
- LOUZADA, G. A. S., CARVALHO, D. D. C., MELLO, S. C. M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I. & BRAÚNA, L. M. 2009. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotropica*, 9(3): 145-149.
- MARIANO, R. L. R. 1993. Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico. In: *Revisão Anual de patologia de Plantas*, 1: 369-409.
- MELO, I. S. 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, L. S. & AZEVEDO, J. L. (Eds.) *Controle biológico. Embrapa Meio Ambiente*, 1: 17-66.
- MORANDI, M. A. B., BETTIOL, W. & GHINI, R. 2005. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: VENZON, M., PAULA JUNIOR, T. J. & PALLINI, A. (Ed.). *Controle alternativo de pragas e doenças*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 247-267.
- PAVAN, M. A. & KUROZAWA, C. 1997. Doenças de alface (*Lactuca sativa*). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A. & REZENDE, J. A. M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Agrônoma Ceres*, 2(4): 18-25.
- POLETO, I. 2010. *Caracterização e manejo do patossistema erva-mate/podridão-de-raízes*. 2010. 97 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- RODRIGUES, J. 2010. *Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*-feijoeiro. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R. & CRUZ, M.E.S. 2003. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, 28(supl.): 554-556.
- SIMON, A., DUNLOP, R. W., GHISALBERTI, E. L. & SIVASITHAMPARAM, K. 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(21): 263-264.