

Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. ao *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas

Glauber Monçon Fipke; Juliano de Bastos Pazini; Luciana Zago Ethur.

Universidade Federal do Pampa, UFP, Campus Itaqui, CEP 97650-000. Itaqui, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mails: gm.fipke@hotmail.com; julianopazzini@hotmail.com; luethur@gmail.com.

RESUMO: O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um fitopatógeno causador de doença em muitas culturas. Um dos métodos de controle é o biológico, com a utilização de fungos antagonistas, como os do gênero *Trichoderma*. Embora existam produtos no mercado a base de *Trichoderma* spp. buscam-se isolados com características antagônicas específicas a esse fitopatógeno. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o antagonismo *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao *S. sclerotiorum*, em cinco temperaturas. Foram desenvolvidos quatro experimentos *in vitro*, utilizando oito isolados de *Trichoderma* e um de *S. sclerotiorum*. O crescimento micelial dos isolados fúngicos e o confronto direto entre os isolados de *Trichoderma* e do patógeno foram avaliados a 15, 22, 25, 30 e 37°C. Avaliou-se a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno na presença de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *Trichoderma* na temperatura de 22 °C. As ações de antagonismo dos isolados de *Trichoderma* ao *S. sclerotiorum* ocorreram na faixa de 22 a 30°C, mas foram inibidas a 15 e a 37°C. Os isolados de *Trichoderma* inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno pela liberação de metabólitos não voláteis. Portanto, conclui-se que o isolado TI-2 de *Trichoderma* spp. apresenta ação antagonista ao *S. sclerotiorum* em diferentes temperaturas e pode ser indicado para participar de programa de controle biológico desse fitopatógeno. Ações de antagonismo dos isolados de *Trichoderma* ao *S. sclerotiorum* ocorrem na faixa de temperatura de 22 a 30°C, sobretudo na maior temperatura.

Palavras chave: Antibiose, controle biológico, mofo branco.

Antagonism of *Trichoderma* spp isolates to *Sclerotinia sclerotiorum* at different temperatures

Abstract: The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is a pathogen, causing disease in many cultures. One of the methods for its control is the biological with the use of antagonistic fungi such as the *Trichoderma*. While there are products in the market based on *Trichoderma* spp. looking up isolates with specific antagonistic characteristics to this pathogen. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. and *S. sclerotiorum* at five temperatures. Four experiments *in vitro* were conducted using eight strains of *Trichoderma* and *S. sclerotiorum*. The mycelial growth of fungal isolates and direct confrontation between *Trichoderma* isolates and the pathogen were evaluated at 15, 22, 25, 30 and 37 °C. The inhibition of mycelial growth of phytopathogenic fungus was evaluated in the presence of volatile and non-volatile metabolites of *Trichoderma* isolates at temperature of 22 °C. The antagonistic actions of *Trichoderma* to *S. sclerotiorum* were in the range of 22 to 30 °C, but were inhibited at 15 and 37 °C. The *Trichoderma* isolates inhibited mycelial growth of the pathogen by releasing non-volatile metabolites. Therefore, it is concluded that the TI-2 isolated from *Trichoderma* spp. presents antagonistic actions to *S. sclerotiorum* at different temperatures and can be indicated to participate in the biological control program for this plant pathogen. The antagonism of *Trichoderma* to *S. sclerotiorum* occur in the temperature range of 22 to 30 °C, especially at the highest temperature.

Key words: antibiosis, biological control, *in vitro*, white mold

Introdução

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary causa doença denominada mofo-branco. Ele pertence a um grupo de fungos de solo que obtém nutrientes na decomposição do hospedeiro, mas não apresenta especificidade, ou seja, é polífago (PEREIRA et al., 2013). Estima-se que cerca de 400 espécies vegetais são suscetíveis ao patógeno, como as culturas da soja (*Glycine max* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.), olerícolas – pepineiro (*Cucumis sativus* L.), frutícolas – morangueiro (*Fragaria* sp. L.) e ornamentais – crisântemo (*Crysanthemum* sp. L.).

O controle de *S. sclerotiorum* mais usual é o químico (DOS SANTOS, 2010), porém, para uma estratégia ideal para o manejo devem-se levar em conta todas as práticas culturais possíveis de serem usadas na lavoura, desde a escolha da área e a aquisição da semente até a colheita e o beneficiamento (PEREIRA et al., 2013).

O controle biológico figura entre as alternativas pesquisadas na atualidade, para fazer parte do manejo integrado de combate ao *S. sclerotiorum*. Para isso, existe a busca constante pelo agente de controle biológico mais efetivo, ou seja, que sobreviva nas mesmas condições ambientais do fitopatógeno, apresente um padrão de antagonismo satisfatório e que não cause danos nos cultivos agrícolas.

Trichoderma spp. é um gênero fúngico amplamente estudado e utilizado no controle biológico de uma gama de fitopatógenos (MACHADO & SILVA, 2013), dentre os quais o *S. sclerotiorum* (ETHUR et al., 2005). A forma de ação dos isolados de *Trichoderma* spp. no antagonismo a fungos fitopatogênicos são: antibiose, hiperparasitismo, competição e indução de defesa do hospedeiro (MACHADO et al., 2012).

O gênero *Trichoderma* apresenta grande variabilidade genética. Por isso é possível encontrar isolados com características morfológicas e fisiológicas bastante distintas (KLEIN e EVERLEIGH, 1998;), responsáveis pela diversidade no antagonismo a um mesmo isolado fúngico fitopatogênico (ETHUR et al., 2005; AULER et al., 2013; MACHADO e SILVA, 2013).

Há estudos que selecionaram *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. contra vários fitopatógenos, inclusive contra *S. sclerotiorum* (ETHUR et al., 2005; DELGADO, 2007). No entanto, os experimentos, no geral, são desenvolvidos em apenas uma temperatura e esse é um dos fatores que influencia o desenvolvimento fúngico (SIVAN et al., 1984; LOBO JÚNIOR e ABREU, 2000). Existem relatos quanto às temperaturas adequadas tanto para *Trichoderma* spp. (MIRANDA et al., 1996) quanto para *S. sclerotiorum* (ADAMS e AYERS, 1979), porém os fungos não têm sido testados simultaneamente em distintas temperaturas. Observa-se para *S. sclerotiorum* que apotécios podem ser formados em solos com temperaturas entre 4,4 °C à 30 °C, o que significa que eles podem ser produzidos ao longo de todo o período vegetativo e reprodutivo da cultura hospedeira, se a umidade for suficiente (CLARKSON et al., 2003).

Logo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o antagonismo *in vitro*, de isolados de *Trichoderma* spp. ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* em cinco temperaturas.

Material e métodos

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

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram retirados de escleródios que foram utilizados como iscas, em quatro solos, nos municípios de Itaqui e Maçambará / RS. Os isolados TI-1, TI-2, TI-3 foram retirados de escleródios colocados em um solo agrícola de Itaqui (lavoura de arroz); TM-1 e TM-2, solo agrícola (lavoura de arroz) de Maçambará; TI-4, solo não agrícola (campo) de Itaqui; e TM-3 e TM-4, solo não agrícola (campo) de Maçambará. O isolado de *S. sclerotiorum* foi retirado de mudas de alface que apresentaram tombamento de pós-emergência, em ambiente protegido.

Temperatura no crescimento micelial do fitopatógeno e isolados de *Trichoderma* spp.

Foram retirados discos de 6 mm de diâmetro, de culturas crescidas por sete dias, dos oito isolados de *Trichoderma* e do fitopatógeno.

Os discos foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar). As placas foram incubadas em câmaras climatizadas, na ausência de luz e nas temperaturas de 15 °C, 22 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C.

Com sete dias de incubação, foi avaliado cada isolado fúngico nas cinco temperaturas, quanto ao diâmetro do crescimento micelial, por medições em cruz, com paquímetro digital. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada placa foi considerada uma repetição.

Confronto direto entre o fitopatógeno e os isolados de *Trichoderma* spp.

Oito isolados de *Trichoderma* spp. e o fitopatógeno foram utilizados no teste de confronto direto (BELL et al., 1982; BARROS et al., 1987; SILVA, 1997; ETHUR et al., 2005; BOMFIM et al., 2010; AULER et al., 2013). Discos

do patógeno e do antagonista foram colocados em extremidades opostas em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram colocadas em câmaras climatizadas nas temperaturas de 15 °C, 22 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C.

A avaliação foi realizada após sete dias, quando foi analisado o crescimento micelial dos fungos nas placas. Para avaliação do teste de confrontação direta, foi seguida a escala de notas (adaptada) proposta por Bell et al. (1982). A adaptação objetivou caracterizar melhor o crescimento tanto do patógeno quanto dos isolados de *Trichoderma*, de forma a representar melhor a interação entre eles (Quadro 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 8 (isolados de *Trichoderma*) x 5 (temperaturas), com 4 repetições. Cada placa foi considerada uma repetição.

Quadro 1 – Escala de notas utilizada na avaliação do teste de confronto direto (Adaptada de Bell et al., 1982).

Nota	Descrição
0	Antagonista e patógeno não se desenvolvem
1	Antagonista cresce e ocupa toda placa de Petri
2	Antagonista cresce sobre o patógeno (2/3 da placa de Petri)
3	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa de Petri (nenhum domina o outro)
4	Patógeno cresce sobre o antagonista (2/3 da placa de Petri)
5	Patógeno cresce e ocupa toda placa de Petri

Metabólitos não voláteis no antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotinia sclerotiorum*

Foi utilizada a técnica dos “pocinhos” (MENOLLI JUNIOR e PACCOLA-MEIRELLES, 2010) para selecionar isolados de *Trichoderma* com potencial antagonista ao *S. sclerotiorum* na produção de metabólitos não voláteis.

Para obter meio líquido com os metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma*, discos de 6 mm de diâmetro contendo micélio e esporos dos oito isolados foram colocados em placas de Petri com 30 mL de meio líquido BD (batata-dextrose). As placas foram mantidas a 25°C, durante três dias. Posteriormente, o meio líquido foi retirado sem a

presença de micélio e esporos dos isolados de *Trichoderma*.

Foram realizadas quatro perfurações na forma de pocinhos de aproximadamente 4 mm de diâmetro, com o auxílio de espátula, em quatro extremidades das placas de Petri, em meio de cultura BDA (30mL), previamente vertido. No centro das placas, foi colocado um disco de micélio de *S. sclerotiorum* e nas perfurações (pocinhos) foi acrescentado 40 µL de meio líquido contendo os metabólitos não voláteis de cada um dos isolados de *Trichoderma*. No controle, foi adicionado água destilada e esterilizada nos pocinhos e o disco do patógeno no centro das placas.

As placas de Petri foram mantidas em

câmara climatizada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante sete dias antes de serem avaliadas. Foi utilizada a temperatura de 22°C , por ser uma das temperaturas em que o fitopatógeno apresentou maior crescimento micelial.

A avaliação foi realizada por meio de escala de notas (Quadro 2) elaborada para a

análise visual da presença ou ausência de halos de inibição associados ao desenvolvimento do micélio do patógeno em relação às perfurações (pocinhos) onde se encontravam os metabólitos dos isolados de *Trichoderma*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos e 4 repetições.

Quadro 2 – Escala de notas para avaliação da ação dos metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial do *Sclerotinia sclerotiorum*.

Nota	Descrição
1	Patógeno cresce sobre toda a placa de Petri, sem interrupção no crescimento.
2	Patógeno cresce sobre toda a placa de Petri, porém com crescimento não contínuo, em etapas, devido aos metabólitos dos isolados de <i>Trichoderma</i> .
3	Patógeno cresce parcialmente sobre a placa de Petri, não cresce nos “pocinhos”, onde se encontram os metabólitos dos isolados de <i>Trichoderma</i> .
4	Patógeno cresce parcialmente sobre a placa de Petri, não cresce em torno e dentro dos “pocinhos” onde se encontram os metabólitos dos isolados de <i>Trichoderma</i> .

Metabólitos voláteis no antagonismo contra *Sclerotinia sclerotiorum*

Foi analisado o efeito de metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, baseado no método descrito por Bharat et al. (1980). As tampas foram retiradas e as bases das Placas de Petri contendo meio BDA, foram posicionadas umas sobre as outras. Na base que ficou alocada para baixo, foi colocado um disco de ágar de 6 mm de *Trichoderma* spp. e na superior um disco de *S. sclerotiorum*. As placas foram vedadas (base com base) e incubadas em câmara climatizada a 22°C .

Após sete dias de incubação, foi avaliado o crescimento micelial do patógeno (base da placa que ficou em cima) pela medição do diâmetro do micélio em cruz, com paquímetro digital. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada placa foi considerada uma repetição.

Análise estatística

Os dados de temperatura foram submetidos à análise de variância e foi realizada a análise de regressão para os tratamentos quantitativos (diferentes temperaturas). Os dados

obtidos de notas não seguiram distribuição normal, portanto foram transformados por raiz de $(x+0.5)$ antes da análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Todos os dados foram submetidos à análise estatística pelo programa ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 1996).

Resultados e discussão

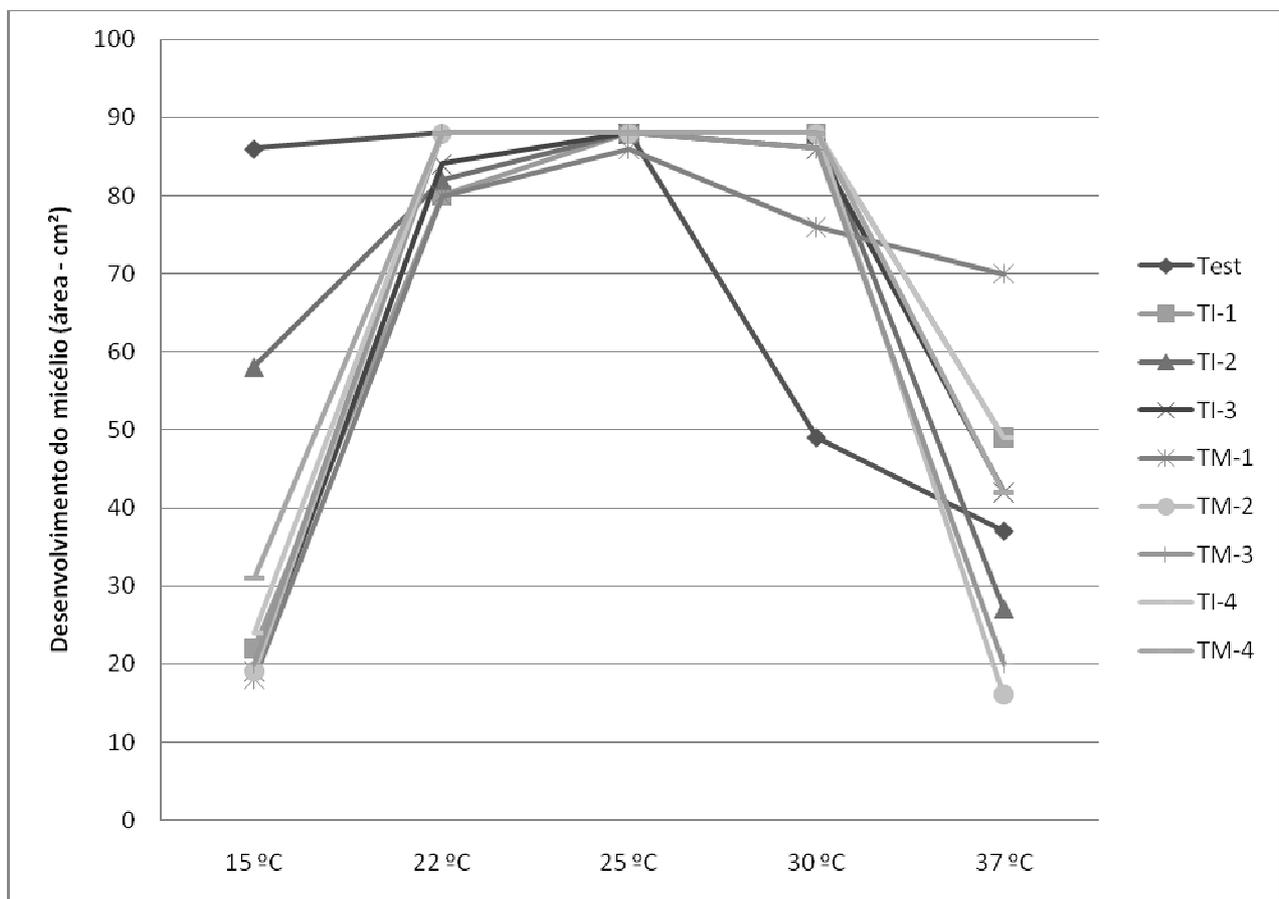
As temperaturas em que os isolados de *Trichoderma* e do fitopatógeno apresentaram maior crescimento ficaram entre 22 e 25°C (Figura 1). Contudo, com exceção de um isolado de *Trichoderma*, houve crescimento micelial até 30°C . O fitopatógeno cresceu até 25°C , e para temperaturas mais altas houve decréscimo (Figura 1). A faixa ótima para o crescimento micelial do gênero *Trichoderma* pode variar entre 25 e 28°C (JAILL et al., 2006) e entre 20 a 30°C (BOMFIM et al., 2010). Para a germinação dos esporos a temperatura ótima está em torno dos 33°C (MIRANDA et al., 1996). Entretanto, para o fitopatógeno a temperatura ideal pode variar de 10 a 30°C (ADAMS e AYERS, 1979) ou de 15 a 20°C (LOBO JÚNIOR e ABREU, 2000),

dependendo do isolado.

S. sclerotiorum cresceu significativamente mais que os isolados de *Trichoderma* a 15 °C. O isolado que mais se aproximou do fitopatógeno a essa temperatura foi o TI-2. Segundo Jaill et al. (2006) isolados de *Trichoderma*, normalmente não crescem em temperaturas abaixo de 17 °C o que é confirmado por Bomfim et al. (2010). O

isolado TM-1 de *Trichoderma* foi o que mais cresceu a 37 °C (Figura 1). De acordo com Adams e Ayers (1979) temperatura de 35 °C durante três semanas pode reduzir a viabilidade dos escleródios do *S. sclerotiorum*. Em geral, os isolados testados também tiveram este tipo de comportamento de crescimento.

Figura 1 - Crescimento micelial (área - cm²) dos isolados de *Trichoderma* (TI-1, TI-2, TI-3, TM-1, TM-2, TM-3, TI-4 e TM-4) e do isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* (Test), em meio de cultura BDA, em cinco temperaturas.



Observou-se que, na faixa de temperatura na qual os fungos foram expostos, o isolado do fitopatógeno teria condições de sobreviver e crescer em temperaturas inferiores a 15 °C, sendo que essa tendência fica evidente devido ao crescimento do fungo a 15 °C ser entre 33 e 79% maior do que os isolados de *Trichoderma*. Segundo Adams e Ayers (1979) o fungo *S. sclerotiorum* sobrevive em temperatura de 10°C.

O isolado de *Trichoderma* (TI-2) e *S.*

sclerotiorum apresentam crescimento semelhante na mesma amplitude de temperatura. Esse fato é, de fundamental importância no estudo de seleção de agentes biocontroladores, uma vez que, o antagonista desenvolve-se nas mesmas condições de temperatura que o patógeno. Ocorreu interação entre o confronto direto de isolados de *Trichoderma* e fitopatógeno com as temperaturas distintas (Tabela 1).

Tabela 1 – Notas* referentes ao confronto direto entre *Sclerotinia sclerotiorum* e isolados de *Trichoderma* em meio de cultura BDA, em temperaturas** distintas.

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Temperaturas			
	15°C	22°C	25°C	30°C
S. sclerotiorum	5,00 aA***	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
TI-1	3,00 bA	2,00 bB	2,50 bcAB	2,00 bB
TI-2	3,00 bA	2,25 bA	1,50 deB	1,00 cB
TI-3	3,00 bA	2,50 bAB	2,25 bcdB	1,50 bcC
TM-1	3,00 bA	2,75 bAB	2,25 bcdAB	2,00 bB
TM-2	3,00 bA	2,50 bA	1,25 eB	1,50 bcB
TM-3	3,00 bA	2,25 bAB	1,75 cdeB	1,00 cC
TI-4	3,00 bA	2,00 bB	3,00 bA	1,00 cC
TM-4	3,00 bA	2,25 bA	3,00 bA	1,00 cB

* Notas: 0- Antagonista e patógeno não se desenvolvem; 5- Patógeno cresce e ocupa toda placa de Petri. Avaliação adaptada de Bell et al. (1982);

**À 37°C não ocorreu desenvolvimento dos fungos;

***Média de notas de 4 repetições. Medias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. (CV% = 7,54).

A 15 °C, os isolados de *Trichoderma* não apresentaram antagonismo ao fitopatógeno, pois ambos cresceram até o centro da placa (Tabela 1). A 37 °C os isolados de *Trichoderma* não cresceram no meio de cultura. Ocorreu antagonismo entre os isolados de *Trichoderma* e o fitopatógeno, nas temperaturas de 22, 25 e 30 °C. A 30 °C, 50% dos isolados de *Trichoderma* apresentaram antagonismo significativamente maior em relação aos demais, com destaque para os isolados TI-2, TM-3, TI-4 e TM-4.

Os resultados sugerem diversidade na ação dos isolados de *Trichoderma* no antagonismo contra o *S. sclerotiorum* e a temperatura apresenta influência marcante nesse processo. Os antagonistas desenvolveram-se sobre toda a placa (nota 1), principalmente na temperatura de 30 °C. Essa temperatura, de acordo com o experimento anterior (Figura 1), não é considerada ideal para o crescimento do fitopatógeno. Segundo Boosalis (1963), a temperatura influencia o grau de hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. em alguns casos e isso devido a diversidade dos isolados (AULER et al., 2013). Foi observado por Sivan et al. (1984), que nas temperaturas de 22 °C e 30 °C, os isolados

de *T. hamatum* e *T. harzianum* reduziram a incidência da doença causada por *Pythium aphanidermatum* em 79% e 73% e em 44% e 91%, respectivamente. Foi comprovado, também, por Auler et al. (2013), que na temperatura de 28 °C, 87% dos isolados de *T. harzianum* testados apresentaram maior crescimento, no confronto direto, com *Sclerotium rolfisii*.

No confronto direto, os isolados de *Trichoderma* spp. desenvolveram-se em sobre meio de cultura em placa de petri, conjuntamente com o fitopatógeno. Nesse ambiente, a temperatura (tabela 1) interferiu nas ações antagônicas realizadas pelos isolados de *Trichoderma* que foram direcionadas ao *S. sclerotiorum*. Essas ações devem ter sido por: competição (MACHADO e SILVA, 2013) por espaço, nutrientes, água, oxigênio e luz; hiperparasitismo (MACHADO e SILVA, 2013) com enovelamento de hifas (FIGUÊIREDO et al., 2010) e antibiose (MACHADO e SILVA, 2013) com a liberação de metabólitos secundários. Figuêiredo et al. (2010) constataram utilizando técnica de microscopia que no confronto direto ocorreu hiperparasitismo na área de interação entre o micélio de isolados de *Trichoderma* e do

S. sclerotiorum. Esses autores observaram alterações morfológicas como formação de anéis de hifas, enrolar de hifas, fragmentação de hifas e micélio sem conteúdo protoplasmático e penetração de hifas do fitopatógeno pelos isolados dos agentes de controle biológico.

Comparando o crescimento micelial do fitopatógeno na presença e na ausência de metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma*, observou-se que 100% deles apresentaram algum grau de inibição, efeito fungistático contra o fitopatógeno (Tabela 2 e Figura 2). A inibição no crescimento micelial do fitopatógeno em alguns casos não foi constante e ocorreu em etapas. Logo, os isolados de *Trichoderma* produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento do *S. sclerotiorum*. Segundo

Bomfim et al. (2010), apesar de produzirem metabólitos capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno, alguns isolados de *Trichoderma* apresentaram instabilidade metabólica, porque ocorreu parada e posteriormente houve a retomada do crescimento de *Rhizopus stolonifer*. Resultados semelhantes de inibição foram encontrados por Bomfim et al. (2010), quando utilizaram isolados de *Trichoderma* contra *Rhizopus stolonifer*, com a técnica do papel celofane poroso. Ethur et al. (2005), também utilizando a técnica do papel celofane poroso, constataram diversidade na inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* por metabólitos não voláteis liberados por isolados de *Trichoderma* em meio de cultura.

Tabela 2 – Notas referentes à avaliação do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em relação à presença de metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma*, colocados em pocinhos, em quatro extremidades das placas de Petri, na temperatura de 22°C.

Notas	Isolados de <i>Trichoderma</i>
1*	Controle
2	TI-1, TM-3, TM-4
3	TM-1, TI-4, TI-3
4	TI-2, TM-2

* Controle – sem a presença de metabólitos dos isolados de *Trichoderma*.

Notas: 1- Patógeno cresce sobre toda a placa de Petri, sem interrupção no crescimento; 2- Patógeno cresce sobre toda a placa de Petri, porém com crescimento não contínuo, em etapas, devido aos metabólitos dos isolados de *Trichoderma*; 3- Patógeno cresce parcialmente sobre a placa de Petri, não cresce nos “pocinhos”, onde se encontram os metabólitos dos isolados de *Trichoderma*; 4- Patógeno cresce parcialmente sobre a placa de Petri, não cresce em torno e dentro dos “pocinhos” onde se encontram os metabólitos dos isolados de *Trichoderma*.

Apenas os isolados de *Trichoderma* TI-2 e TM-2 apresentaram nota de inibição igual a quatro (Tabela 2), ou seja, seus metabólitos paralisaram o crescimento do fitopatógeno em torno dos pocinhos, vindo a formar escleródios nas extremidades da placa de Petri, entre os pocinhos (Figura 2). De acordo com Bomfim (2010), entre os efeitos provocados pelos antibióticos, observa-se a redução e/ou paralisação do crescimento micelial, da esporulação e germinação de esporos, além de distorção de hifas e endólise. Além disso, os autores supracitados acrescentam que os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de seus produtores, e podem ser mais

importantes na inibição de outros organismos do que a competição por nutrientes.

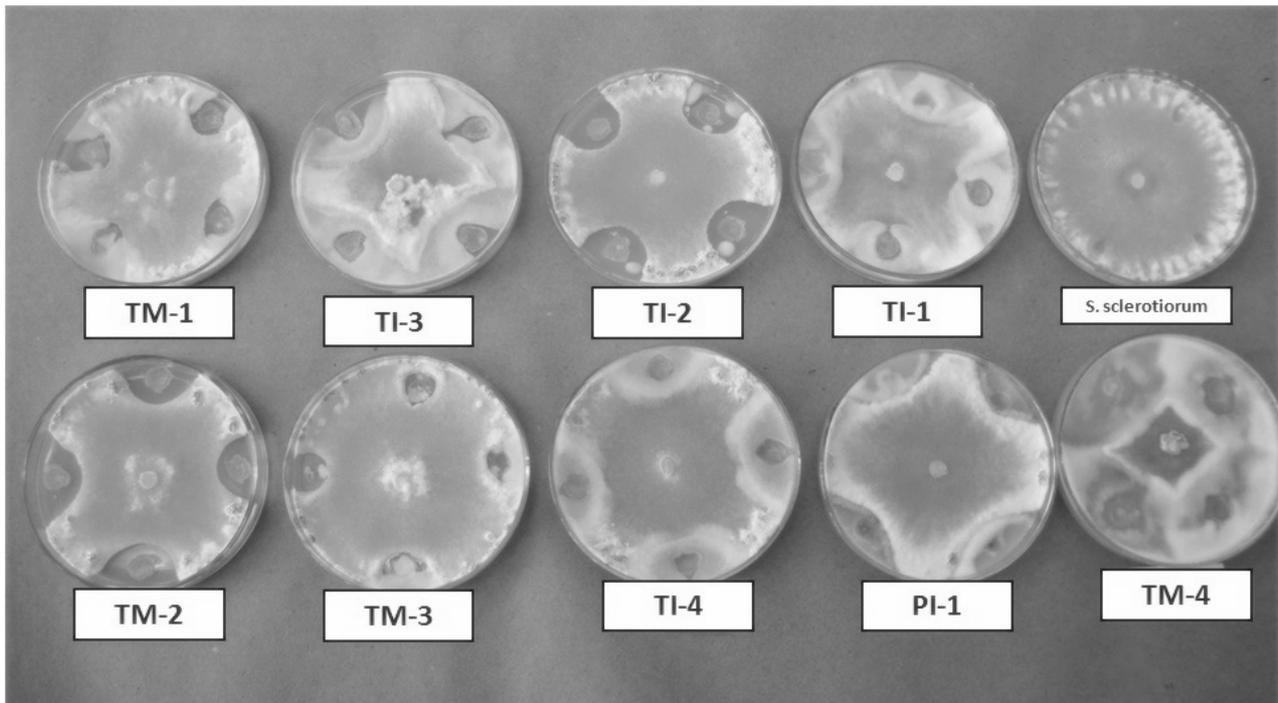
Não ocorreram diferenças significativas entre as médias de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno na presença de metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma*. A ação dos metabólitos voláteis de *Trichoderma* pode ser evidenciada pela redução do crescimento micelial (cm²) do fitopatógeno, constatada pela medição. O controle, apresentou crescimento de 70,56 cm². Na presença do isolado TI-4 ocorreu a menor inibição do crescimento micelial (69,31 cm²). Os isolados TI2 e TM2, que receberam a melhor nota para inibição por metabólitos não voláteis (Tabela 2,

Figura 2), apresentaram inibição, embora não significativa, no crescimento do fitopatógeno em 12% (62,26 cm²) e de 4% (67,68 cm²), respectivamente, pela liberação de metabólitos voláteis.

Isolados de *Trichoderma* apresentam liberação de metabólitos voláteis e não-voláteis, porém existe necessidade de pesquisas nessa área para ter-se conhecimento sobre o processo de antibiose que é desencadeado por esse gênero fúngico, conhecido agente de controle biológico. Segundo Tamimi & Hutchinson (1975) juntamente com os metabólitos voláteis, pode-se encontrar gases como etileno, cianeto de hidrogênio, acetaldeído, acetona, etanol e dióxido de carbono. Segundo Bomfim (2010) os gases que são liberados pelos fungos afetam o crescimento microbiano e são ativos a baixas concentrações, porém não são considerados antibióticos.

O isolado TI-2 de *Trichoderma* foi o que apresentou maior potencial antagonístico entre os utilizados nesse trabalho. Deve-se salientar que esse isolado foi retirado de solo agrícola e esse fator deve ser considerado, pois sobreviveu em um ambiente de estresse devido à aplicação de insumos agrícolas e na presença de fitopatógenos no geral. Nesse sentido, existe uma premissa de que no ambiente agrícola ocorre perda de diversidade microbiológica, porém não é encontrado nenhum relato referente a problemas com perda de potencial antagonístico de isolados de *Trichoderma* ou outro agente de controle biológico. De acordo com Louzada et al. (2009), a origem dos isolados de *Trichoderma* spp., que foram retirados de diferentes solos agrícolas e não agrícolas, com diversidade de culturas, não estava relacionada com o seu potencial antagonístico contra *S. sclerotiorum* e *Fusarium solani*.

Figura 2 - Crescimento micelial do *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* colocados em pocinhos, em quatro extremidades das placas de Petri. (PI-1 – isolado de *Pythium*, não foi utilizado na avaliação final).



Conclusões

O isolado TI-2 de *Trichoderma* spp. apresenta ação antagonista ao *S. sclerotiorum* em temperaturas semelhantes às exigidas pelo fitopatógeno e pode ser indicado para participar de programa de controle biológico desse fitopatógeno.

Ações de antagonismo dos isolados de *Trichoderma* ao *S. sclerotiorum* geralmente ocorrem na faixa de temperatura de 22 a 30 °C, sobretudo na maior temperatura.

Referências

- ADAMS, P. B. e AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**. Saint Paul, v.69, n.8, p.689 – 899, 1979.
- AULER, A.C.V.; CARVALHO, D.D.C. e MELLO, S.C.M. de. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@ambiente**, v. 7, p. 359-365, 2013. Disponível em: revista.ufr.br/index.php/agroambiente.
- BARROS, I.B.I. et al. Avaliação do potencial antagonico de *Trichoderma* sp. em relação a *Sclerotinia minor*. **Anais...** In: REUNIÃO ANUAL SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., 1987. São Paulo, 1987.
- BELL, D.K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, p.379-382, 1982.
- BHARAT, R. et al. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**. v.57, p.131-135, 1980.
- BOMFIM, M. P. et al. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p. 61-67, 2010.
- BOOSALIS, M.C. Hiperparasitism. **Annual review of Phytopathology**. v.2, p.363-375, 1963.
- CLARKSON, J.P. et al. Ascospores release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, v. 107, p. 213-222, 2003.
- DELGADO, G. V. et al. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro*. In: **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, n.214. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 12p. 2007.
- DOS SANTOS, J. et al. Atividade hiperparasítica de *Trichoderma* spp. sobre escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em solo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 7, 2010. **Anais...EPAMIG**, 2010. Online. Disponível em: http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=121&dir=DESC&order=date&limit=10&limitstart=10. Acesso em: 29 ago.2012.
- ETHUR, L.Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**. v.30, p.127-133, 2005
- FIGUÊIREDO, G.S. et al. Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.1-9, 2010.
- JAILL, C. et al. **Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* T-39 y la relación interbiótica con *Botrytis cinera* procedente de tomate**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago. 2006.
- KLEIN, D. e EVERLEIGH, D.E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). **Trichoderma & Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis, 1998. Cap.1, p. 57-74.
- LOBO JR, M. e ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.24, p.521-526, 2000.

- LOUZADA, G.A.S. et al. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.
- MACHADO, D.F.M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, p. 01-05, 2012.
- MACHADO, D.F.M. e SILVA, A.C.F.da. *Trichoderma* no controle *in vitro* de fungos presentes em diásporos de *Gochnatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, p. 07-09, 2013.
- MIRANDA, I. et al. Aplicacion de la metodologia de superficie respuesta em laoptimizacion del crecimiento y esporulacion de *Trichoderma* sp. **Revista Protección Vegetal**, v. 11, p. 99-103, 1996.
- MENOLLI JÚNIOR, N. e PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Obtenção de linhagens de *Lentinula edodes* resistentes a temperaturas elevadas e seleção de linhagens resistentes ao *Trichoderma* sp. **Ciência Agrotécnica**, v. 34, p. 1640-1646, 2010.
- PEREIRA, et al. Estratégias de controle de mofo branco do feijoeiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, p. 1354-1370, 2013.
- SILVA, A.C.F. **Uso de radiação gama para obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai. e *T. viride* Pers. Fr. com capacidade melhorada no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.** 1997. 100f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.
- SILVA, F.A.S. e AZEVEDO, C.A.V. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, 1996. **Anais...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p. 294-298.
- SIVAN, A. et al. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. **Phytopathology**, v. 74, p. 498-501, 1984.
- TAMIMI, K. M. e HUTCHINSON, S. A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 64, p. 455-463, 1975.

Recebido em: 05/09/2012

Aceito em: 08/05/2014