

AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DO FUNGO *TRICHODERMA SPP.* E *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* IN VITRO.¹

ANTERO, E.D.P.²
BRANDÃO, Renata Silva³

RESUMO

O mofo-branco é uma doença de fundamental importância, sendo responsável por elevadas perdas na produção agrícola, sendo o controle biológico uma alternativa para seu controle. Objetivou-se avaliar o antagonismo e eficiência dos metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma spp.* para competir e inibir o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. Para a avaliação de metabólitos voláteis utilizou-se o método modificado de Bharat et al. Placas de Petri com BDA foram posicionadas uma sobre as outras, sendo colocado na placa do centro um disco de micélio de *Trichoderma spp.* e na superior e inferior o patógeno. Para tanto, os isolados foram confrontados com o patógeno em cultura pareada, e tiveram seus metabólitos avaliados sobre o crescimento do patógeno nos ensaios de metabólitos voláteis. Observou-se um grande potencial antagonístico de *Trichoderma spp.* em cultura pareada e que os metabólitos produzidos são capazes de inibir o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro.

Palavras-chave: Controle Biológico. Fitopatógeno. Metabólitos Voláteis. Preamento.

ABSTRACT

White mold is a disease of fundamental importance, being responsible for high losses in agricultural production, and biological control is an alternative for its control. The objective was to evaluate the antagonism and efficiency of volatile metabolites produced by *Trichoderma spp.* to compete and inhibit the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. For the evaluation of volatile metabolites, the modified method of Bharat et al. Petri dishes with PDA were positioned one above the other, with a mycelium disc of *Trichoderma spp.* placed on the center plate. and in the upper and lower the pathogen. Therefore, the isolates were confronted with the pathogen in a paired culture, and their metabolites were evaluated on the pathogen's growth in the volatile metabolite assays. A great antagonistic potential of *Trichoderma spp.* in paired culture and that the metabolites produced are capable of inhibiting the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro.

¹ Trabalho de Conclusão de Curso orientado pelo(a) professor(a) Renata Silva Brandão, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia no segundo semestre de 2022, na Faculdade de Inhumas FacMais.

² Acadêmico(a) do 10º Período do Curso de Agronomia da FacMais. E-mail: eduardoantero@aluno.facmais.edu.br.

³

Key Words: Biological control. Phytopathogen Peering. Volatile Metabolites. Pairing.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro tem apresentado crescimento exponencial nos últimos anos, em virtude da incorporação tecnológica no manejo e nos insumos e conseqüente aumento da área plantada. Entretanto, práticas fitossanitárias mal empregadas associadas a esse aumento expressivo de produtividade, resultam na disseminação e multiplicação de pragas e patógenos em áreas cultivadas (VENTUROSOSO et al., 2013).

Doenças fitopatológicas, são responsáveis por grandes danos que refletem no insucesso da alta de produção agrícola em diversas culturas, e um desses patogênicos de extrema importância é o agente causal da doença conhecida como mofo branco, que se dissemina também via semente, podendo atingir longas distâncias e se introduzir em áreas antes inatingíveis (MEYER et al., 2013; JACCOUD FILHO et al., 2017).

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo patogênico que possui elevada agressividade e baixa especificidade e alta agressividade, associado a mais de 400 espécies de plantas, fator que torna difícil o manejo devido ao amplo espectro de hospedeiros (BOLAND e HALL, 1994).

O patógeno é capaz de se desenvolver em temperaturas entre 5°C e 30°C, entretanto sua faixa ideal se situa entre 11°C e 25°C, com solo úmido e alta umidade (ABAWI; GROGAN 1975, BOLTON et al., 2006). É necessária a integração de métodos de controle cultural, químico e biológico, pois em medidas isoladas de controle o agente causal do mofo branco não responde satisfatoriamente (NETO et al., 2016). Proteger os sítios de infecção da planta e reduzir o inóculo no solo, são os objetivos do controle (MACENA et al., 2011; MEYER et al., 2019a).

O fungo *Trichoderma spp.* corresponde a fase anamórfica do gênero Hypocreales que pertence ao filo Ascomycota (AGRIOS, 1997). Comumente são encontradas espécies de *Trichoderma spp.* como componentes da microbiota em quase todos os tipos de solos, em especial os orgânicos, incluindo, solos agrícolas, cama de húmus das florestas e em pomares, onde

podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (ROIGER, 1991). O *Trichoderma spp.* age como micoparasita necrotrófico eficiente no controle de muitos fungos fitopatogênicos, especialmente os que têm estruturas de resistência que atrapalham o ataque por outros microrganismos (MELO, 1998).

O agente de controle biológico consiste na utilização de organismos que atuam como biocontroladores, objetivando o combate de doenças fúngicas, o fungo do gênero *Trichoderma spp.* constituem fontes de enzimas degradadoras de parede de outros fungos, são simbioses de plantas, oportunistas, fortes competidores no ambiente do solo, são, também, importantes produtores de antibióticos e parasitas de fungos fitopatogênicos (KUMAR et al., 2012), controlando e diminuindo a pressão do inóculo da doença no campo.

O presente trabalho teve por objetivo analisar isolados de *Trichoderma spp.* quanto ao antagonismo e à sua capacidade de produção de metabólitos voláteis, para competir e inibir o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro.

2. METODOLOGIA

O estudo foi conduzido no laboratório da Faculdade de Inhumas – FacMais. Para a condução do experimento, os isolados de *Trichoderma spp.* e do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* foram fornecidos pela Embrapa Arroz e Feijão, pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa, Santo Antônio de Goiás-GO. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso e os resultados submetidos à análise de variância, com médias separadas pelo teste de Duncan (5%).

2.1 Avaliação do antagonismo em cultura pareada

O *Trichoderma spp.* e o patógeno foram submetidos ao método da confrontação direta (ETHUR et al., 2005). Discos de ágar contendo micélio dos fungos (5 mm de diâmetro) foram retirados de colônias com setes dias de cultivo e depositados, simultaneamente, em extremidades opostas das placas de Petri, contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar) solidificado, as placas incubadas são submetidas a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Gabarito da escala adaptada de Rodrigues (2010) com notas variando

de 1 a 7. A nota 1 significa a máxima eficiência em colonização de *Trichoderma* spp. e a nota 7 a completa colonização da placa com *Sclerotinia sclerotiorum*. Santa Maria (RS), 2012.

2.2 Metabólitos voláteis

Com base no método de (BHARAT et al.1980), o teste de metabólitos voláteis, foi conduzido sendo colocadas as tampas ou fundos das placas de Petri com o mesmo tamanho (diâmetro) umas sobre as outras, após ter vertido meio BDA em cada uma delas. O antagonista foi semeado no centro da placa, na superior e na inferior o patógeno, ambos na forma de discos de ágar (1 cm) contendo micélio e conídios. O patógeno inoculado na placa sem o antagonista para testemunha. As tampas foram vedadas lateralmente com membrana plasmática e logo em seguida, incubadas os materiais em temperatura ambiente.

A avaliação foi realizada assim que a testemunha desenvolveu até a borda da placa, com o auxílio de um paquímetro o diâmetro das colônias foram medidas.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de metabólitos voláteis, do isolado de *T. harzianum* exibiu ação antifúngica, pois inibiu em 78% o crescimento do patógeno, sendo estatisticamente significativo (Tabela. 1).

Esses metabólitos produzidos por *T. harzianum* desempenham papel determinante na supressão do crescimento micelial do patógeno, considerando que ambos os fungos compartilhariam a mesma câmara de crescimento. Portanto, tal evento puramente fungistático, seria determinante no controle da doença disseminada por sementes e também no caso das causadas por patógenos que habitam o solo, corroborando com o resultados de diversos autores, tais como: AGÜERO et al. (2008) e DE BOER et al. (2003).

Tabela 1. Efeito inibidor de metabólitos voláteis de *T. harzianum* sobre o crescimento de *S. sclerotiorum*

Tratamentos	Metabólitos voláteis
Sem <i>T. harzianum</i> apenas <i>S. sclerotiorum</i>	100 B
<i>T. harzianum</i>	100 B
<i>Fusarium solani</i> + <i>S. sclerotiorum</i>	28 A

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

No teste de cultivo pareado, observou-se a inibição do crescimento micelial *in vitro* de *S. sclerotiorum* quando confrontado a *Trichoderma harzianum*, apresentando nota 1 conforme a escala de Bell et al. (apud SILVA, 2007), em todas as repetições. Nesta escala, fungos com notas ≤ 2 apresentam potencial antagônico. Verificou-se que o isolado tem um potencial antagônico, inibindo o crescimento micelial em 75% (Tabela. 2).

Nesse estudo os autores acusam uma colonização de mais de 70% do fitopatógeno, corroborando com nossos resultados. Pacheco et al. (2016) verificaram a inibição da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma spp.* em condições de laboratório.

Segundo Carvalho et al. (2014), esse mecanismo contribui para a atividade antagônica, notadamente quando espaço e nutrientes são limitados e, talvez, seja este o principal mecanismo de ação antagonista desses fungos.

Tabela 2. Médias do crescimento micelial de *Trichoderma harzianum*, em ensaio de confrontação direta

Tratamentos	Crescimento micelial (cm)
Sem <i>T. harzianum</i> apenas <i>S. sclerotiorum</i>	1B
<i>T. harzianum</i>	1B
<i>S. sclerotiorum</i> + <i>T. harzianum</i>	2A

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir com este trabalho que o fungo benéfico *Trichoderma harzianum* apresenta ótimo potencial antagônico de inibição de crescimento micelial, e produz metabólitos voláteis com o potencial de inibir o desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, fungo causador do mofo-branco.

REFERÊNCIAS

ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, p.300-309, 1975.

AGRIOS, Patologia Vegetal da G.N. 4 ed. Academia Press: San Diego, 635 p. (1997). Ageitec - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **ÁRVORE DO**

CONHECIMENTO: feijão. Doenças Fúngicas do Solo. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. Disponível em:, acessado em 25 abril de 2022.

AGÜERO, L. E. M. et al. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* Rifai. **Interciência**, Caracas, v. 33, p. 219-222, 2008.

BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp.. **Planta e Solo**, v.57, p.131-135, 1980.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

CARVALHO, D.D.C., LOBO JUNIOR, M., MARTINS, I., INGLIS, P.W. & MELLO, S.C.M. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, 39: 384-391

DE BOER, W. et al. Microbial community composition affects soil fungistasis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 835-844, 2003. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.2.835-844.2003>.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. R.; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

KUMAR, K.; AMARESAN, N.; BHAGAT, S.; MADHURI, K.; SRIVASTAVA, R.C. Isolamento e caracterização de *Trichoderma* spp. para atividade antagônica 6 contra podridão radicular e patógenos foliares. **Indian Journal of Microbiology**, v.52, n.2, p.137-144, 2012.

MACENA, A. M. F.; CANTERI, M. G.; FERREIRA JUNIOR, J. P. Espaçamento e manejo de restos culturais para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1871-1873, 2011.

MELO, I.S., Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S. de .; AZEVEDO, J. L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; NUNES JUNIOR, J.; VENANCIO, W.S.; GODOY, C.V. Chemical control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) on soybean in Brazil. **Acta Phytopathologica Sinica**, Beijing, v 43, p.137. 2013.

NETO, A. J. A., ALVES, Á. G., STANGARLIN, J. R., COPPO, J.C., RAMPIM, L., RISSATO, B.B., FATECHA, D. A. F., LORENZETTI, E., GIACOMELLI, P. S.,

BELMONTE, C. (2016). Efficiency of commercial products for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in soybean cultivar NS 5909 RG. **African Journal of Agricultural Research**, Published online, v.11, n.31, p. 2833-2840, aug. 2016. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/cited-by-article/73AB72459807> . Acesso em 18/03/22.

Pacheco, K.R.; Viscardi, B.S.M.; Vasconcelos, T.M.M. De; Moreira, G.A.M.; Vale, H.M.M. & Blum, L.E.B. (2016). Efficacy of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. reesei* against *Sclerotium rolfsii*. **Bioscience Journal** 32(2): 412-421.

ROIGER, T.C.; JEFFERS S.N.; CALDWELL, R.W. Ocorrência de espécies trichoderma em pomar de maçã e solo florestal. **Biologia do Solo e Bioquímica**, Grã-Bretanha, v. 43, n. 4, p. 353-359, 1991.

VENTUROSOS, L. dos R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; VENTUROSOS, L. A. C.; ESPINDOLA, D. L. P.; SANTOS, J. A. E. dos. Produção de soja e germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes coberturas de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.615-626, 2013.