

# **Boletim de Pesquisa** 214 **e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 340 Dezembro, 2007

---

**INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE  
*Sclerotinia sclerotiorum* POR  
*Trichoderma* SPP. IN VITRO**

*Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 214*

## **INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Sclerotinia sclerotiorum* POR *Trichoderma* SPP. IN VITRO**

Delgado, G.V.  
Martins, I.  
Menêzes, J.E.  
Macedo, M.A.  
Mello, S.C.M.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*  
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*  
Membros: *Arthur da Silva Marante*  
*Maria de Fátima Batista*  
*Maurício Machain Franco*  
*Regina Maria Dechechi Carneiro*  
*Sueli Correa Marques de Mello*  
*Vera Tavares de Campos Carneiro*  
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*  
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*  
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

- I 56 Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. in vitro / G. V. Delgado ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.  
12 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 214).

1. *Sclerotinia sclerotiorum* - inibição do crescimento - *Trichoderma* spp. 2.  
Controle biológico. I. Delgado, G. V. II. Série.

632.96 - CDD 21.

## INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Sclerotinia sclerotiorum* POR *Trichoderma* SPP. IN VITRO

---

**Delgado, G.V.<sup>1</sup>**

**Martins, I.<sup>2</sup>**

**Menêzes, J.E.<sup>3</sup>**

**Macedo, M.A.<sup>4</sup>**

**Mello, S.C.M.<sup>5</sup>**

### RESUMO

Fungos antagonistas do gênero *Trichoderma*, vêm sendo largamente estudados como agentes de biocontrole de diversos fitopatógenos. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é causador de diversas doenças em diferentes culturas, como podridão mole, mofo branco, tombamento pré-emergente e pós-emergente de plantas. O presente trabalho teve como objetivo verificar a capacidade de isolados de *Trichoderma* em inibir o crescimento de *S. sclerotiorum*. Para o experimento foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* spp. e um isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*. A verificação do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra o patógeno *S. sclerotiorum* foi realizada utilizando-se a metodologia de cultura pareada. O delineamento foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições. A avaliação da inibição do crescimento do patógeno foi realizada pela medição do diâmetro das colônias, aos 15 dias após o pareamento. Verificou-se, também, a germinação dos escleródios formados no pareamento. Os isolados CEN 219, CEN 277 e CEN 281 causam maior inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*. Os isolados CEN 282, CEN 283, CEN 285 e CEN 286 inibem completamente a germinação dos escleródios.

---

<sup>1</sup> Agronomia, graduando, Universidade de Brasília - UnB

<sup>2</sup> Biologia, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>4</sup> Agronomia, graduanda, Universidade de Brasília - UnB

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## INTRODUÇÃO

Devido a seu amplo espectro de ação, propriedades físico-químicas e a versatilidade na adaptação aos mais diversos ambientes, fungos antagonistas do gênero *Trichoderma* (Pers.), vêm sendo largamente estudados como agentes de biocontrole de diversos fungos fitopatogênicos (Silva, 2000).

O *Trichoderma* pode interagir com o patógeno de diversas maneiras, tais como antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação ou indução de defesa do hospedeiro (Gauch, 1996). Algumas espécies do gênero também possuem potencial para disponibilizar nutrientes na rizosfera a ponto de reduzir a necessidade de adubação nas culturas (Harman, 2000). O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é causador de diversas doenças em diferentes culturas, como podridão mole, mofo branco, tombamento pré-emergente e pós-emergente de plantas. Estima-se que cerca de 300 espécies vegetais são suscetíveis a *S. sclerotiorum*, a exemplo do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e da soja (*Glycine max*), ambas de grande importância econômica.

O fungo possui, ainda, ampla gama de hospedeiros, apresentando estruturas de resistência para preservação da espécie. Essas estruturas são os escleródios, os quais podem persistir em várias camadas do solo. O presente trabalho teve como objetivo verificar a capacidade de isolados de *Trichoderma* em inibir o crescimento de *S. sclerotiorum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Trichoderma* e *S. sclerotiorum* utilizados neste trabalho pertencem à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

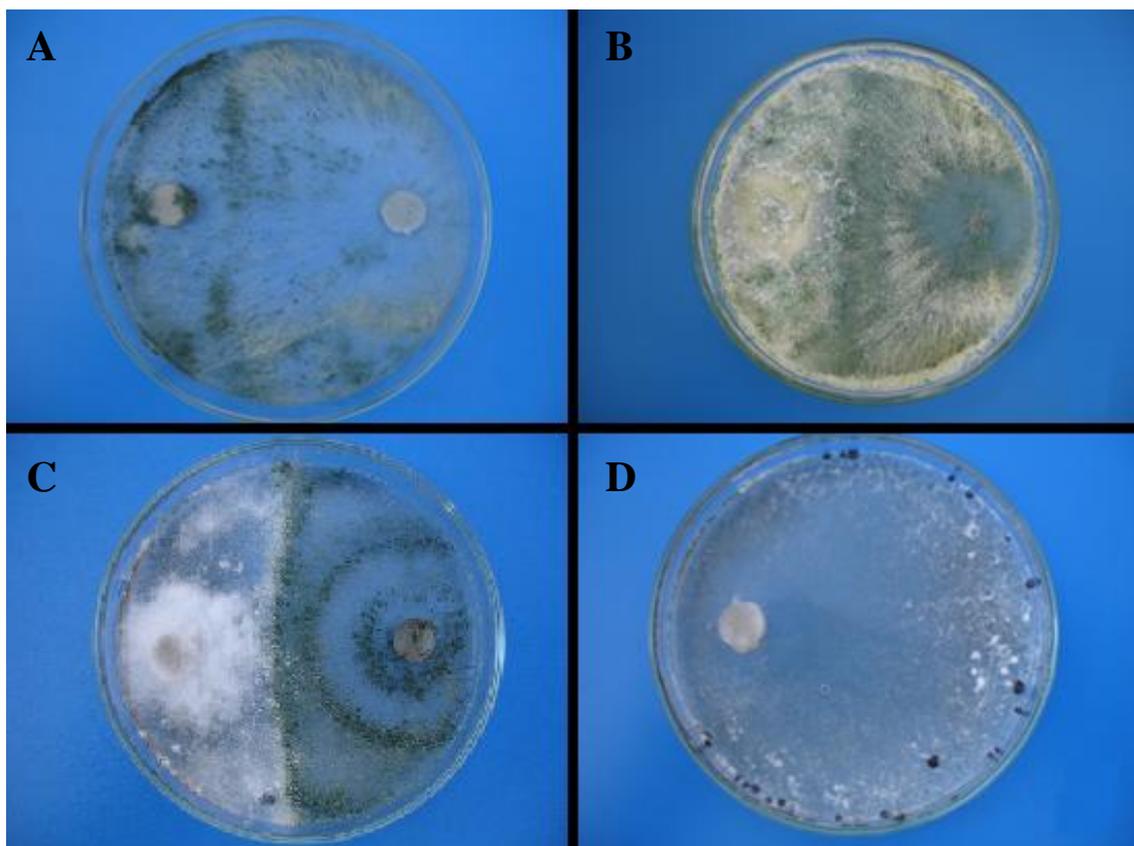
Para o experimento foram utilizados os isolados de *Trichoderma pseudokoningii* (CEN 209), *T. inhamantum* (CEN 277), *T. aureoviride* (CEN 278), *T. stromaticum* (CEN 279), *T. longibrachiatum* (CEN 280),

*Trichoderma* sp. (CEN 281, CEN 282, CEN 283, CEN 284, CEN 285, CEN 286 e CEN 219) e *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN 217).

A verificação do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra o patógeno *S. sclerotiorum* foi realizada utilizando-se a metodologia de cultura pareada descrita por Dennis & Webster (1971). Inicialmente, procedeu-se à inoculação do meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Placas de Petri, contendo 20 mL do meio, receberam dois discos de micélio/ágar de 9 mm de diâmetro cada, que foram colocados em extremos opostos da placa, e distantes 1 cm da lateral da placa, sendo um do patógeno e outro do agente candidato a biocontrole. Como testemunhas, utilizaram-se placas inoculadas unicamente com o patógeno.

O delineamento foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições, onde as placas foram distribuídas em câmara de incubação a 25°C, no escuro. Após 7 dias de cultivo, uma das repetições de cada isolado foi retirada da BOD para a confecção de lâminas e observação em microscopia ótica. Para a montagem da lâmina foi recortada um quadrado nas proporções de 1 mm x 1 mm da zona de confronto, região limítrofe, e coradas com *Cotton Blue*. A avaliação da inibição do crescimento do patógeno foi realizada pela medição do diâmetro das colônias, aos 15 dias após o pareamento, período em que as placas da testemunha (inoculadas apenas com o patógeno) apresentaram-se totalmente colonizadas. As avaliações foram realizadas com base na determinação do diâmetro das colônias.

Os valores médios da porcentagem de inibição foram calculados em relação à testemunha, utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, através do programa "ESTAT". Fez-se a comparação dos isolados em relação à capacidade antagonista, com base na escala de notas de 1, 2, 3, 4 e 5 de Bell et al. (1982) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Notas atribuídas aos isolados de *Trichoderma* spp. quanto a inibição de crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA: A. *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; B. *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; C. *Trichoderma* e o patógeno ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; D. Testemunha.

#### **Germinação de escleródios**

Com 15 dias de cultivo, os escleródios produzidos nas placas foram recolhidos e lavados com água estéril e uma solução de hipoclorito à concentração de 1%. Os escleródios foram mergulhados por 30 segundos na solução e 30 segundos em água estéril, repetindo-se o processo por três vezes. Depois de realizado esse procedimento, foram colocados em novas placas com meio BDA, para verificar o poder germinativo após o contato com o *Trichoderma*. Três placas foram separadas como testemunha, com escleródios que

passaram pelo mesmo processo de lavagem, mas que não tiveram contato com o agente de controle. Foram colocados cinco escleródios em cada placa de BDA e mantidos à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 14 dias.

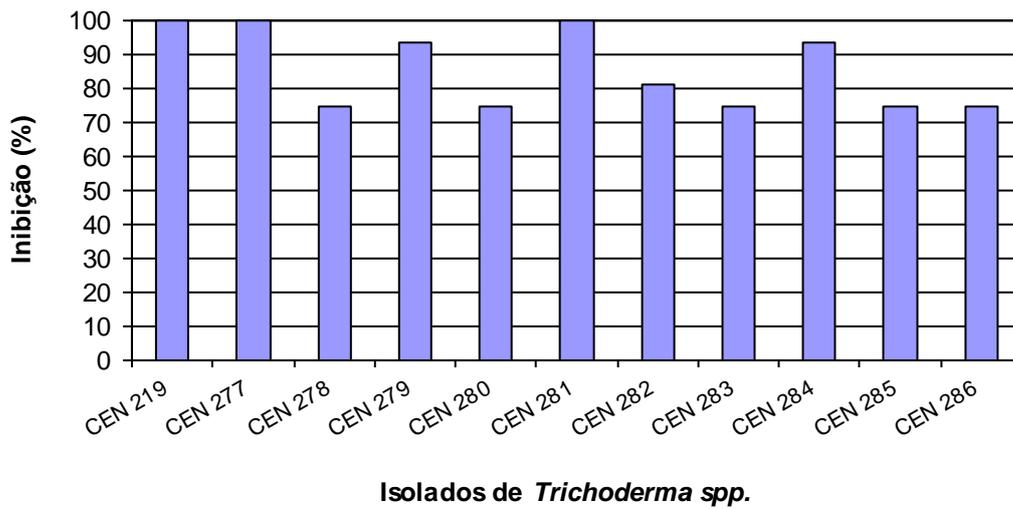
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar nas lâminas, obtidas a partir das placas com 7 dias de inoculadas, várias mudanças na morfologia do patógeno, como por exemplo, a maceração, o enrolamento e o parasitismo das hifas (Fig. 2).



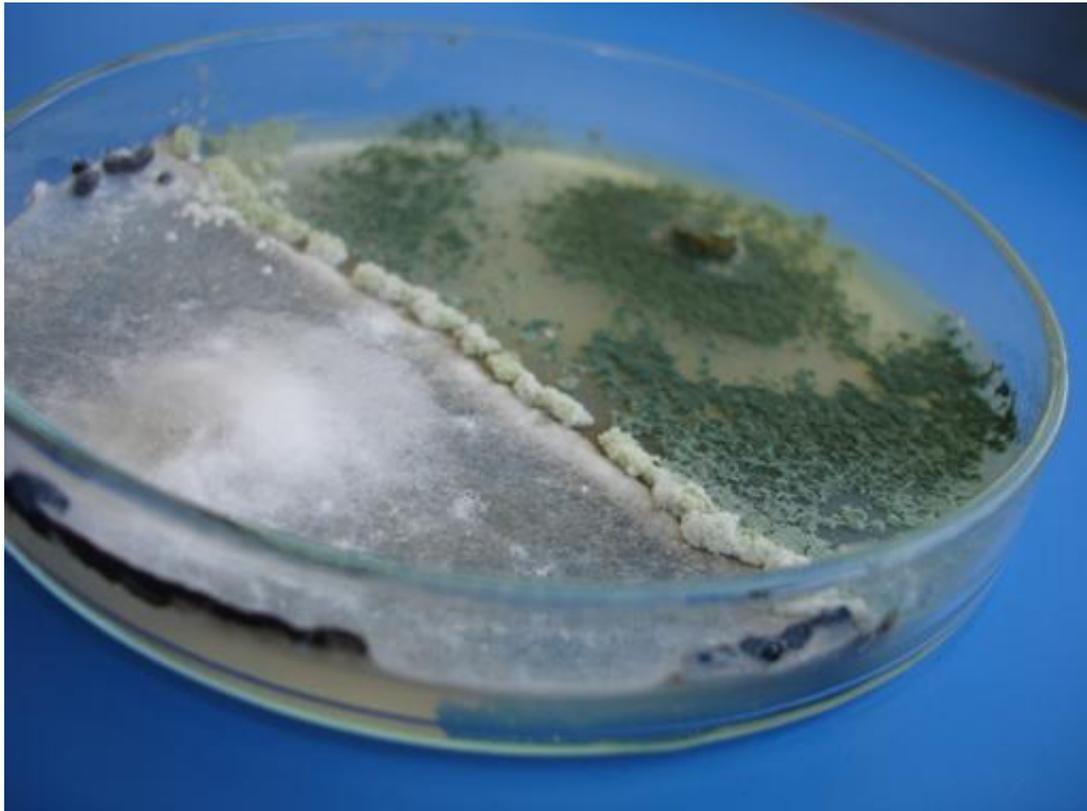
**Fig. 2.** Morfologia da *Sclerotinia sclerotiorum* parasitada por isolado de *Trichoderma*.

Maiores valores médios de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* foram obtidos com os isolados CEN 219, CEN 277 e CEN 281, embora todos os isolados tenham sido classificados como altamente antagônicos (Fig. 3). Silveira et al. (1994) encontraram resultados semelhantes com isolados de *Trichoderma* spp., evidenciando a capacidade variável de inibir o crescimento micelial e produção de escleródios de *S. rolfsii* em feijão e caupi.



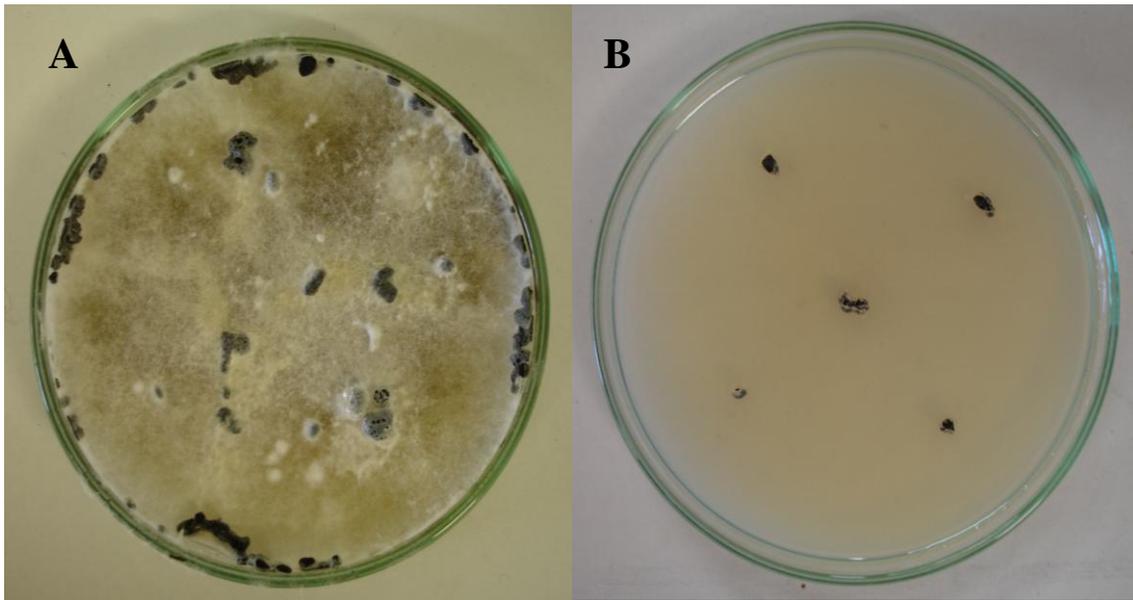
**Fig. 3.** Porcentagem de inibição da *Sclerotinia sclerotiorum* pelos isolados de *Trichoderma* spp.

Verificou-se, também, que os isolados CEN 278 e CEN 280, formaram uma barreira de conídios para impedir o avanço do patógeno (Fig. 4). Segundo Bell et al. (1982) a capacidade de produção de antibióticos pelos antagonistas, podem interferir no desenvolvimento do fitopatógeno, bem como a competição destes por espaço e nutrientes.



**Fig. 4.** Inibição do crescimento do *S. sclerotiorum* pelo isolado de *Trichoderma* CEN 280.

O teste de germinação dos escleródios apresentou resultados eficientes para alguns isolados. A placa testemunha que passou pelo mesmo processo de lavagem teve a germinação de todos os escleródios, enquanto as que estiveram em contato com o agente de controle não germinaram (Fig. 5). Os isolados CEN 282, CEN 283, CEN 285 e CEN 286 conseguiram inibir completamente o patógeno.



**Fig. 5.** Teste de germinação de escleródios 14 dias após o pareamento: A) Testemunha, B) Escleródios sem germinar após contato com o isolado CEN 282.

Estes isolados serão utilizados em futuros estudos em casa de vegetação e campo, para controle do mofo branco em feijoeiro e soja.

## CONCLUSÕES

Os isolados CEN 219, CEN 277 e CEN 281 causam maior inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*.

Há formação de barreira de conídios pelos isolados CEN 278 e CEN 280 para impedir o avanço do patógeno.

Os isolados CEN 282, CEN 283, CEN 285 e CEN 286 inibem completamente a germinação dos escleródios.

## REFERÊNCIAS

Bell, D.K.; Wells, H.D.; Markham, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p.379-382, 1982.

Dennis, C.; Webster, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v. 57, p. 363-369, 1971.

Gauch, F. **Micoparasitismo de espécies de *Pythium* com oogônio equinulado e o controle de *Pythium ultimum* Trow causador de tombamento de mudas, em hortaliças.** 1996. 94 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, n. 4, 2000.

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 rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n. 1 p. 3-9, 2007.

Silva, P.R.Q. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes egfp e (-tubulina)**. 2000. 129 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

Silveira, N.S.S.; Michereffi, S.J.; Menezes, M.; Takaki, G.M.C. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 1, p. 22-25, 1994.