

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS DO FEIJOEIRO CV. CARIOCA E CONTROLE DE *SCLEROTINIA SCLEROTIURUM*

Selection of isolates of *Trichoderma* spp. in promoting the growth of seedlings of bean cv. Carioca and control *Sclerotinia sclerotiorum*

Anderson Rossi de Aguiar, Daniele Franco Martins Machado, Juçara Terezinha Paranhos e Antonio Carlos Ferreira da Silva
danifmartins@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria - Departamento de Biologia

Resumo

O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Trichoderma* spp. visando à sobrevivência de mudas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. carioca na presença de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, bem como a promoção de crescimento desse cultivo. No experimento *ex vitro*, visando à sobrevivência de plantas de feijão, foram utilizados quatro tratamentos (presença dos isolados IT₂, IT₃ e IT₄ de *Trichoderma viride* + controle sem *Trichoderma* spp.) em substrato Plantmax® inoculado com *S. sclerotiorum*. O experimento da promoção do crescimento de plantas de feijão foi conduzido na ausência e presença de pó biológico da mistura dos três isolados de *T. viride* (IT₂, IT₃ e IT₄) em substrato esterilizado e não esterilizado, totalizando quatro tratamentos. Nos dois estudos, os trata-

mentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com sete repetições e três plantas por repetição. Os isolados IT₂, IT₃ e IT₄ promoveram as maiores porcentagens de sobrevivência das plantas de feijão ao mofo branco (84,56; 65,32; 96,87% e 73,50; 43,17; 96,87%; aos 21 e 35 dias, respectivamente), diferindo significativamente dos tratamentos controle (0 e 9,32%, respectivamente). A mistura dos três isolados de *T. viride* promoveu as maiores alturas das plantas, em substrato esterilizado e não esterilizado (23,69 e 20,42 cm, respectivamente), comparados aos tratamentos sem os isolados (13,78 e 16,375 cm, respectivamente). Na presença de pó-biológico, as médias de massa seca da parte aérea foram superiores (6,42 e 6,579 g) e diferiram do substrato esterilizado na ausência de pó-biológico (3,98 g). Conclui-se que os isolados testados de *T. viride* são eficientes no controle de *S. sclerotiorum*, apresentando maiores porcentagens de plantas de feijão sobreviventes. A mistura dos isolados também promove o crescimento de mudas de feijão cultivar carioca.

Palavras-chave: mofo branco, *Phaseolus vulgaris*, controle biológico.

Summary

The aim of this work was isolated from *Trichoderma* spp. aimed at the survival of seedlings of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. carioca in the presence of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, as well promoting growth from that cultivation. The experiment aiming to *ex vitro* survival of bean plants were used four treatments (presence of isolated IT₂, IT₃ and IT₄ of *Trichoderma viride* + control without *Trichoderma* spp.) Plantmax® in inoculated with *S. sclerotiorum*. The experiment has sought to control *S. sclerotiorum ex vitro* in bean plants, it were employed four treatments (absence and presence of isolated IT₂, IT₃ and IT₄ *Trichoderma viride*) in substrate Plantmax® inoculated with *S. sclerotiorum*. The experiment in promoting bean plant growth was led in presence and absence of biological powder, from the mixture of three isolates of *T. viride* (IT₂, IT₃ and IT₄), either in sterilized or not substrate, resulting in four treatments. In two of the studies, the treatments were ordered in outlining purely random, with seven repetitions and three plants in each of them. Isolates IT₂, IT₃ and IT₄ afforded the highest survival rate among the bean plant against white mold (84,56; 65,32; 96,87% and 73,50; 43,17; 96,87% at 21 days and 35 days, respectively) unlike the control treatments (0% and 9,32%,

respectively). The mixture of the three isolates of *T. viride* promoted the highest plants, either using sterilized substrate or not (23,69 cm and 20,42 cm, respectively) if compared to the treatments without isolates (13,78 cm and 16,375 cm, respectively). In the presence of biological powder the averages of dry mass were higher (6,42 and 6,579 g) and different from the sterilized substrate without biological powder (3,98 g). We conclude that the isolates tested *T. viride* are effective in controlling *S. sclerotiorum*, presenting higher percentages of bean plants survivors. The mixture of isolates also promotes the growth of seedlings of bean cv. Carioca.

Key Words: White mold, *Phaseolus vulgaris*, biological control.

Introdução

O mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary) é uma das principais doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), como também de várias outras culturas no Brasil e no mundo. Esse fitopatógeno habita o solo sobrevivendo por meio de estruturas de resistência chamadas de escleródios, e possui mais de 400 espécies hospedeiras. Seu ataque é bastante severo em condições de alta umidade relativa do ar e do solo, e também em temperaturas amenas, reduzindo a produtividade (BOLAND & HALL, 1994; BOLTON et al., 2006). As medidas de controle mais comumente recomendadas para o combate ao mofo branco, como inundação, rotação de culturas e aplicação de fungicidas são pouco eficientes. Dessa maneira, evidencia-se a importância de estudos alternativos visando ao controle dessa doença.

As espécies de *Trichoderma* têm mostrado, em diferentes culturas de importância agrícola, antagonismo à *Sclerotinia* spp., principalmente em condições de ambiente controlado. *Trichoderma* spp. são, sem dúvida, os agentes de controle biológico de fitopatógenos mais estudados e utilizados no Brasil e no mundo (MORANDI & BETTIOL, 2009), devido às suas características de antagonismo e por serem fungos naturais isolados do solo e da rizosfera, tendo um maior sucesso no controle de doenças radiculares do que nas doenças foliares. Linhagens desse fungo antagonista vêm recebendo grande atenção na pesquisa, devido a sua versatilidade de ação, sendo utilizadas no controle de fitopatógenos através da associação ou não de parasitismo, antibiose e competição; além das suas ações como indutores de resistência de plantas contra

doenças, bem como promotores de crescimento de plantas e aumento da biomassa radicular (HARMAN et al., 2004; ETHUR et al., 2005; FORTES et al., 2007; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009), representando uma alternativa promissora para minimizar o impacto de produtos químicos e a redução de suas doses de aplicação.

A promoção de crescimento de plantas pela aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. foi inicialmente relacionada ao controle de microrganismos prejudiciais presentes na rizosfera e/ou no solo e, mais recentemente, tem sido relacionada à produção de hormônios ou fatores de crescimento; maior eficiência no uso de alguns nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (CONTRERAS-CORNEJO, 2009).

O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Trichoderma* spp., visando à sobrevivência de mudas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. carioca na presença de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, bem como à promoção de crescimento desse cultivo.

Material e métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Interação Planta-Microrganismos e casa de vegetação do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Seleção de isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos a partir de amostras de 500g de solo, retiradas de uma profundidade de até 10 cm, em área de cultivo de hortaliças, no campus da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS. Para isso, utilizou-se o método de iscas (GHINI & KIMATI, 1989), modificado por ETHUR et al. (2005). A identificação dos isolados selecionados foi feita através de microscópio estereoscópico e ótico, com base na bibliografia (BARNETT & HUNTER, 1998).

Oito isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram maior crescimento radial em cm, em meio BDA (batata, dextrose, ágar), foram utilizados para o teste de cultura pareada *in vitro* para verificar o comportamento antagônico contra um isolado de *S. sclerotiorum*, pertencente à coleção do Laboratório de Interação Planta-Microrganismos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Discos de meio BDA contendo micélio do patógeno e do isolado de *Trichoderma* spp. foram colocados em lados opostos em placa de Petri. Após sete dias em câmara climatizada a 22°C, foi realizada a avaliação, de acordo com a seguinte escala de notas, modificada de BELL et al. (1982): 1 – *Trichoderma* spp. cresce e toma toda placa; 2 – *Trichoderma* spp. cresce e toma 2/3 da placa; 3 – *Trichoderma* spp. e o patógeno crescem até a metade da placa, nenhum organismo domina o outro; 4 – Patógeno cresce e toma 2/3 da placa e 5 - Patógeno cresce e toma toda placa. Utilizando-se esse critério, foram feitas avaliações 7 e 14 dias após os antagonistas terem sido transferidos para a placa de confrontação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada um dos oito tratamentos com os isolados IT1, IT2, IT3, IT4, IT5, IT6, IT7 e IT8.

Sobrevivência de mudas de feijoeiro cv. carioca inoculadas com *S. sclerotiorum*

Para o experimento *ex vitro*, visando à sobrevivência de mudas de feijoeiro inoculadas com *S. sclerotiorum*, foram utilizados três isolados (IT2, IT3 e IT4), identificados segundo RIFAI (1969) como *Trichoderma viride*, os quais obtiveram as melhores notas no teste *in vitro* de cultura pareada com o patógeno *S. sclerotiorum*, nos seguintes tratamentos com plantas de feijão, cultivar carioca: (T1) vaso contendo o patógeno; (T2) vaso contendo o patógeno e o isolado IT2; (T3) vaso contendo patógeno e o isolado IT3 e (T4) vaso contendo patógeno e o isolado IT4. Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições. Foram postas para germinar três sementes de feijão por vaso, contendo 500g de substrato Plantmax®. O patógeno e os antagonistas foram cultivados em BDA durante sete e 10 dias, respectivamente, a 25°C na ausência de luz, sendo transferidos 10 discos de BDA com micélio e esporos para cada isolado por tratamento e 10 discos de BDA, contendo micélio do patógeno. O fitopatógeno foi inoculado no estágio vegetativo V2 (desdobramento das folhas primárias) e os isolados antagonistas foram inoculados três dias após a inoculação do patógeno. O desenvolvimento das plantas deu-se em câmara climatizada, com temperaturas alternadas de 15°C e 20°C, na ausência e presença de luz (fotoperíodo de 16 horas), respectivamente, e umidade controlada. Após 35 dias, foi avaliado o número de plantas vivas

sem sintomas da doença causada por *S. sclerotiorum*, e determinada a porcentagem de plantas sobreviventes por repetição. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e cada tratamento foi feito com sete repetições.

Desenvolvimento *ex vitro* de feijoeiros

No estudo da promoção de crescimento *ex vitro* de plantas de feijão cultivar carioca, foi utilizada a concentração de 1g de pó biológico da mistura dos isolados IT₂, IT₃ e IT₄ de *Trichoderma viride* (10^8 UFC - unidades formadoras de colônias, por grama de pó biológico) para 500g de substrato Plantmax® esterilizado (1 hora em autoclave a 120°C/1 atm por três vezes, com intervalo de 24 horas) e substrato não esterilizado, na ausência de fitopatógenos inoculados.

A produção do pó biológico seguiu a metodologia descrita por ETHUR et al. (2005). Em sacos de polipropileno, foram adicionados 400g de grãos de arroz com 25 mL de água destilada e autoclavados por 20 minutos, nas mesmas condições utilizadas para os substratos. Em seguida, foram adicionados discos de micélios dos isolados de *T. viride* e postos para incubar por 15 dias a 25°C, na ausência de luz, e, após, realizada a secagem a 30°C por 10 dias. O substrato seco de arroz colonizado foi triturado em liquidificador doméstico e peneirado (peneira 16 Mesh) para produção do pó biológico. A concentração de UFC da mistura de pós biológicos (10^8 UFC.g⁻¹) foi determinada antes da inoculação no substrato, através da diluição de inóculo colonizado em água destilada, transferência da suspensão diluída de 10^2 esporos.mL⁻¹ em meio BDA e contagem do número de colônias.

Os tratamentos foram os seguintes: (T₁) substrato esterilizado mais pó biológico da mistura de isolados de *T. viride*; (T₂) substrato não esterilizado mais pó biológico da mistura de isolados; (T₃) somente substrato esterilizado; (T₄) somente substrato não esterilizado.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e cada tratamento foi realizado com sete repetições. Foram cultivadas três plantas por repetição em vaso contendo 500g de substrato, em estufa com irrigação controlada e temperatura ambiente (26°C±2°C). A avaliação foi efetuada por planta no estádio reprodutivo R8 (enchimento das vagens) através da determinação do crescimento (altura em cm da parte aérea) e a massa seca da parte aérea (g).

Análise estatística

Foi realizada análise de variância dos experimentos, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para análise dos resultados, os dados em porcentagem foram transformados em arco-seno da raiz quadrada ($x/100$).

Resultados e discussão

Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. no teste de confrontação direta

Os oito isolados selecionados de *Trichoderma* spp. apresentaram variação nos resultados a partir do teste de confrontação direta contra *S. sclerotiorum* em dois diferentes períodos de incubação (Figura 1).

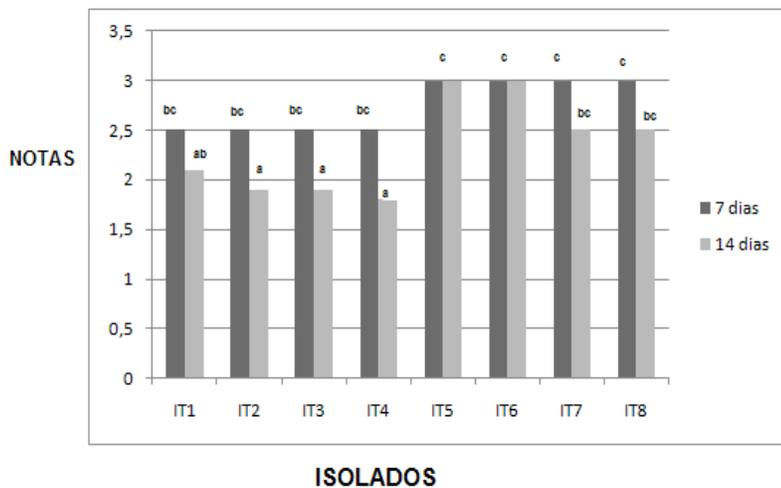


Figura 1: Notas de confrontação direta *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum* aos 7 e 14 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Aos sete dias de incubação, nenhum dos isolados mostrou diferenças significativas entre as médias de notas de confrontação, no entanto, aos 14 dias, os tratamentos com os isolados IT2, IT3 e IT4 apresentaram os melhores resultados, tomando parte do patógeno com crescimento em mais de 2/3 das placas, sendo estes três isolados selecionados para os testes de antagonismo *ex vitro* de *S. sclerotiorum* em plantas de feijão. No confronto direto do agente de biocontrole com o fitopatógeno, podem ocorrer ações antagônicas, como antibiose, hiperparasitismo e

competição (ETHUR et al., 2005), sendo essas características favoráveis que visam à seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com capacidade de antagonismo *ex vitro* a fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas de feijão. Os métodos *in vitro*, além de serem práticos, servem como uma seleção preliminar para avaliar a capacidade antagonista e também indicam o comportamento do microrganismo, com relação a sua capacidade de adaptação, crescimento e reprodução *in vitro*.

Sobrevivência de mudas de feijoeiro cv. carioca inoculadas com *S. sclerotiorum* *ex vitro*

A presença dos isolados IT2, IT3 e IT4 no experimento *ex vitro*, visando ao controle de *S. sclerotiorum*, afetaram significativamente a porcentagem de plantas sobreviventes de feijão (Figura 2).

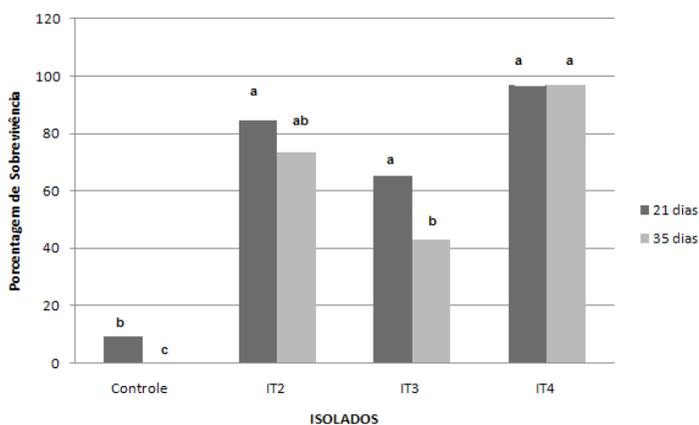


Figura 2: Porcentagem de plantas vivas de feijão inoculadas com *S. sclerotiorum* em tratamento com isolados de *Trichoderma* spp. aos 21 e 35 dias da semeadura. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 21 dias da semeadura, embora os tratamentos com os isolados não tenham mostrado diferenças significativas entre si, apresentaram resultados superiores para a sobrevivência das plantas em relação ao tratamento controle. No entanto, aos 35 dias da semeadura, o tratamento com o isolado IT4 apresentou a maior média de porcentagem de sobrevivência, não diferindo significativamente apenas do tratamento com o isolado IT2.

Espécies de *Trichoderma* têm mostrado antagonismo à *S. sclerotiorum* em condições de laboratório, casa de vegetação e campo. LYNCH (1987) verificou que um isolado de *T. harzianum* teve uma grande atividade de biocontrole *in vitro* contra *S. sclerotiorum* em alface, e que outros isolados inibiram a produção de escleródios em teste de cultura pareada. Além disso, um dos isolados reduziu eficientemente o número de plantas mortas de alface; porém, foi observado um efeito inibitório no desenvolvimento das raízes sobreviventes.

Desenvolvimento de plantas de feijão por *Trichoderma* spp. em solo esterilizado e não esterilizado

Os tratamentos contendo a mistura dos isolados IT₂, IT₃ e IT₄ de *T. viride* na forma de pó biológico em substrato esterilizado e não esterilizado apresentaram os melhores resultados (23,69 e 20,42 cm, respectivamente) para o crescimento de plantas de feijão, quando comparados aos tratamentos controle, sem os isolados, em substrato esterilizado e não esterilizado (13,78 e 16,375 cm, respectivamente). A massa seca foi superior em substrato esterilizado na presença de pó-biológico (6,42 g), quando comparado ao tratamento em substrato esterilizado na ausência de pó-biológico (3,98 g). A presença de outros microrganismos naturais benéficos no substrato não esterilizado, bem como outros fatores podem ter cooperado para os resultados, pois os tratamentos com pó biológico (6,42 g e 6,579 g) não diferiram significativamente do tratamento com substrato não-esterilizado na ausência do pó-biológico (Tabela 1).

Tabela 1: Médias do crescimento e massa seca da parte aérea por planta de feijão cv. carioca no estágio reprodutivo R8.

Tratamentos	Médias por planta (parte aérea)	
	Altura (cm)	Massa seca (g)
Substrato esterilizado + Pó-biológico	23,690 a	6,420 a
Substrato não esterilizado + Pó-biológico	20,420 b	6,579 a
Substrato esterilizado	13,780 c	3,980 b
Substrato não esterilizado	16,375 c	5,509 ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A promoção de crescimento ocasionada por microrganismos do solo ocorre devido à ação de vários fatores ainda pouco esclarecidos, podendo envolver produção de hormônios vegetais, produção de vitaminas ou conversão de materiais a uma forma útil para a planta, absorção e translocação de minerais e controle de patógenos. Diversos trabalhos mostram o efeito benéfico de espécies de *Trichoderma* no desenvolvimento vegetal. FILHO et al. (2008) concluíram que o isolado CEN 262 de *Trichoderma* spp. proporcionou maior índice de desenvolvimento de partes aéreas de mudas de eucalipto. Estudos realizados com *Arabidopsis thaliana* investigaram o papel da auxina produzida e isolada de *Trichoderma* spp. na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta em resposta à inoculação de *T. virens* e *T. atroviride*, desenvolvendo um sistema de interação fungo-planta, o qual resultou em características fenotípicas relacionadas com a auxina, como o aumento da produção de biomassa e estimulação do desenvolvimento das raízes laterais (CONTRERAS-CORNEJO, 2009). Plântulas de milho com 10 dias mostravam maior produção de biomassa e, após terem os seus solos infestados com os fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum* e *Colletotrichum graminicola*, não foram afetadas com os sintomas severos das doenças (HARMAN, 2004).

Algumas linhagens aumentam a superfície total do sistema radicular, possibilitando um maior acesso aos elementos minerais (HARMAN, 2004). Outras são capazes de solubilizar e disponibilizar para a planta o fósforo, ferro, cobre, manganês e zinco do solo. Também podem melhorar os mecanismos ativos de absorção, bem como aumentar a eficiência da planta para utilizar alguns nutrientes importantes, como o nitrogênio (ALDOMARE et al., 1999).

Conclusão

Os isolados de *T. viride* (IT₂, IT₃ e IT₄), obtidos através do método de iscas e selecionados através de cultura pareada *in vitro*, são eficientes no controle de *S. sclerotiorum* e apresentam maiores porcentagens de plantas de feijão sobreviventes. A mistura dos isolados na forma de pó biológico também promove o crescimento da parte aérea de mudas de feijão cultivar carioca.

Referências

- ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p.2926- 2933, 1999.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4° ed. Minneapolis. Burgess Publishing Company, 2006.
- BELL, D.K. et al. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, p.379-382, 1982.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, p.93-108, 1994.
- BOLTON, M.D. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.7, n.1, p.1-16, 2006.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A. et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.149, n.3, p.1579 – 1592, 2009.
- ETHUR, L.Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.2, p.127-133, 2005.
- FILHO, M.R.C. et al. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** 226. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- FORTES, F. de O.; SILVA, A.C.F. da; ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v.31, n 2, p 221-228, 2007.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagonísticos a *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1989. 13p. (Boletim de Pesquisa, 3).

HARMAN, G.E. et al. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Plant Physiology**, v.94, n.2, p.146 - 153, 2004.

HOYOS-CARVAJAL, L. et al. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological control**, v.51. p.409-416, 2009.

LYNCH, J.M. In vitro identification of *Trichoderma harzianum* as a potential antagonist of plant pathogens. **Current Microbiology**, v.16, p.49-53, 1987.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas** (editores). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.07-14, 2009.

RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v.116, p.1-56, 1969.

Submetido em: 04/07/2011

Aceito em: 04/12/2012