

CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE MICROESCLERÓDIOS DE *Macrophomina phaseolina* CONFRONTADO COM DIFERENTES ISOLADOS DE *Trichoderma* sp.

Laline Broetto^{1*}; Sidiane Coltro-Roncato¹; Cristiane Cláudia Meinerz¹; Omari Dangelo Forlin Dildey¹; Paulo César Pazdiora¹; Edilaine Della Valentina Gonçalves¹; Alice Jacobus de Moraes¹; Nicanor Pilarski Henkemeier¹; Odair José Kuhn¹; José Renato Stangarlin¹

SAP 7893 Data envio: 01/04/2013 Data do aceite: 24/10/2013

Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471

Marechal Cândido Rondon, v. 13, n. 4, out./dez., p.310-317, 2014

RESUMO - Podridão de carvão é uma doença que ocorre em muitas espécies de plantas e, além de não ser controlada economicamente por fungicidas, não há genótipos com resistência. Associado a esse problema no controle, existe também uma crescente conscientização no manejo correto do uso de defensivos agrícolas ou na busca por novas tecnologias de manejo de doenças de plantas ambientalmente mais seguros. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo examinar *in vitro* o potencial de diferentes isolados de *Trichoderma* sp. para controle biológico de *Macrophomina phaseolina*. Foram utilizados 17 isolados de *Trichoderma* sp., em dois diferentes testes: confronto direto com o patógeno e produção de compostos voláteis pelo antagonista. Nas condições experimentais os diferentes isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram variação na capacidade de inibição do crescimento do patógeno. Os isolados TI1, TM2, TM3, TM4, TLB2, TLB3, TLB15 e TLB17 foram os que apresentaram maior antagonismo ao fungo *M. phaseolina*.

Palavras-chave: controle biológico, confronto direto, composto volátil, podridão carvão.

*Mycelial growth and production of microsclerotia of *Macrophomina phaseolina* confronted with different isolates of *Trichoderma* sp.*

ABSTRACT - Charcoal rot is a disease that occurs in a large number of plant species and besides not being economically controlled by fungicides no genetic resistance has been found. Associated with this controlling problem, there is also a growing awareness of the proper handling of pesticides or of the search for new and environmentally safer technologies for controlling plant diseases. Therefore this study aimed to examine *in vitro* the potential of different isolates of *Trichoderma* sp. for biological control of *Macrophomina phaseolina*. Seventeen isolates of *Trichoderma* sp. were used, in two different tests: direct confrontation with the pathogen and production of volatile compounds by the antagonist. In the experimental conditions the different isolates of *Trichoderma* sp. showed variation in the capacity of inhibition of the pathogen growth. Isolates TI1, TM2, TM3, TM4, TLB2, TLB3, TLB15 and TLB17 were those that showed the greatest antagonism to the fungus *M. phaseolina*.

Key words: biological control, direct confrontation, volatile compound, charcoal rot.

INTRODUÇÃO

Macrophomina phaseolina é o agente causal da podridão de carvão, doença que ocorre em mais de 500 espécies de plantas (BABU et al., 2010). O fungo *M. phaseolina* é um habitante natural do solo, que infecta as raízes quando esta passa por um período de estiagem e é seguida de períodos chuvosos. As raízes debilitadas ou mortas durante a estiagem servem de substrato para o fungo que entra em atividade durante o período seguinte de umidade (ALMEIDA et al., 2005). O patógeno sobrevive em sementes e no solo pela formação de estruturas de resistência, denominadas microesclerócios, os quais podem sobreviver no solo ou em restos de cultura por mais de dois anos (SMITH; WYLLIE, 1999).

Esta doença não é controlada economicamente por fungicidas e nenhuma fonte de resistência genética foi encontrada devido ao grande número de espécies hospedeiras do patógeno. Além disso, a rotação de cultura nem sempre é possível de ser utilizada para o manejo desta doença (ALMEIDA et al., 2003a; ALMEIDA et al., 2003b).

No Brasil, a questão do uso dos defensivos agrícolas é preocupante, pois segundo Spadotto et al. (2004), no período entre 1964 e 2004, o consumo de agrotóxicos no País aumentou 700%, sendo que nos últimos três anos o Brasil vem ocupando o lugar de maior consumidor de agrotóxicos no mundo, consumindo em média um bilhão de litros de agrotóxicos por ano (ABRASCO, 2012).

Em contrapartida, a crescente conscientização dos problemas causados no ambiente pelos produtos químicos tem impulsionado a busca por tecnologias e o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas, considerados ambientalmente mais seguros (STANGARLIN et al., 2008). Dessa forma, diversas pesquisas vêm testando produtos alternativos que visem reduzir os problemas fitossanitários (BETTIOL et al., 2005).

Um agente biológico que tem sido catalogado como excelente para controle de fungos causadores de doenças em diferentes espécies de plantas é o *Trichoderma* spp. (ARGUMEDO-DELIRA et al., 2009), que são fungos naturais de solos de clima temperado e tropical e que podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (HARMAN et al., 2004).

Várias espécies desse fungo que vivem em solos, de forma saprofítica ou parasitando outros fungos, têm sido utilizadas tanto para controle de patógenos radiculares, como, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. e *Armillaria* spp., como da parte aérea, como, *Venturia* spp. e *Botrytis* spp. (GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

É importante se estabelecer e testar inicialmente *in vitro* coleções de culturas de *Trichoderma* sp., pois bons antagonistas estão dispersos por diferentes regiões do país. A formação de coleções de culturas é de real importância pela possibilidade de se disponibilizar esses organismos para estudos e testes pela comunidade científica (LOUZADA et al., 2009).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo examinar *in vitro* o potencial de diferentes isolados de *Trichoderma* sp. para controle biológico de *Macrophomina phaseolina*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Marechal Cândido Rondon, Paraná.

O isolamento do fungo *Macrophomina phaseolina* foi realizado a partir de tecidos doentes de uma planta de soja, sendo utilizado para cultivo o meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas de Petri com BDA e o patógeno foram mantidas a 25 °C com fotoperíodo de 12 h (ALFENAS et al., 2007).

Para isolamento do *Trichoderma* sp., foi coletado solo de nove locais diferentes no Oeste do Paraná. Após a coleta, o isolamento do fungo *Trichoderma* sp. foi realizado pelo método de isca, que consistiu em inserir no solo escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Quando estes foram parasitados por *Trichoderma* sp. procedeu-se o isolamento (ETHUR et al., 2005) e a identificação em nível de gênero. Os isolados de *Trichoderma* foram enviados ao Instituto Biológico de São Paulo para identificação das espécies.

Além dos nove isolados de *Trichoderma* sp. coletados de solos da Região Oeste do Paraná foram utilizados oito isolados cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Itaqui, Rio Grande do Sul.

Para o confronto direto foi utilizado o teste de pareamento de culturas. Para isso, um disco de meio de cultura BDA (10 mm de diâmetro) contendo micélio do patógeno foi colocado a uma distância de 0,5 cm do bordo de uma nova placa de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas por 24 h a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, foi colocado um disco de meio de cultura (10 mm de diâmetro) contendo micélio de *Trichoderma* na outra extremidade da placa. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h (ETHUR et al., 2005).

As avaliações foram realizadas após oito dias do acréscimo do patógeno, de acordo com os critérios (Tabela 1) propostos por Bell et al. (1982) e adaptado por Rodrigues (2010).

A avaliação da produção de compostos voláteis foi realizada a partir do cultivo do patógeno com o antagonista na mesma atmosfera, mas em meios de cultura isolados. Para este fim, foram repicados para o centro de placas de Petri contendo meio BDA o antagonista e em outra placa de Petri o patógeno. Posteriormente, retiraram-se as tampas das duas placas de Petri e com auxílio de filme de PVC as placas contendo os dois organismos foram unidas, proporcionando a vedação, de forma que cada organismo cresceu isoladamente no meio ao fundo de cada placa (ETHUR et al., 2005).

As avaliações do crescimento micelial do patógeno foram realizadas após 2, 3, 4, 5 e 6 dias do início do teste, enquanto que as avaliações da produção de

microescleródios aos 3, 4, 5 e 6 dias após. As avaliações foram realizadas através da medição do diâmetro de crescimento do patógeno.

Para avaliação dos metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* sp, foi coberto assepticamente toda a superfície do meio (BDA), com discos de papel celofane (9 mm de diâmetro). A seguir, discos de ágar contendo micélio mais conídios de *Trichoderma* sp. Foram colocados no centro, sobre a superfície do papel celofane (DENNIS; WEBSTER, 1971). As placas foram incubadas por 48 h à temperatura

ambiente, sob luz contínua. Após as 48 h, as placas com antagonistas já estabelecidas sobre o papel celofane foram abertas em câmara asséptica, e retirou-se o papel celofane juntamente com as colônias dos antagonistas. Posteriormente foram colocados discos de 7 mm de diâmetro retirados das margens das colônias do fitopatógeno. As placas foram mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h. A testemunha foi constituída de placas contendo apenas o fitopatógeno sem a presença de metabólitos.

TABELA 1. Escala utilizada para teste de pareamento de culturas proposto por Bell et al. (1982) e adaptado por Rodrigues (2010).

Notas	Escala de avaliação
1	Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno
2	Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não sobre o patógeno
3	Antagonista cresce sobre ¾ da placa de Petri
4	Antagonista cresce sobre 2/3 da placa de Petri
5	Antagonista e patógeno crescem até metade da placa de Petri
6	Patógeno cresce sobre 2/3 da placa de Petri
7	Patógeno cresce por toda a placa de Petri

Para cálculo da porcentagem de inibição foi aplicado a fórmula: % inibição = $[(crtest - crtrat) / crtest] \times 100$, onde: crtest = produção radial testemunha; crtrat = produção radial tratamento (MENTEN et al., 1976).

Para cálculo da velocidade do crescimento micelial e da produção de microescleródios do patógeno foi aplicado a fórmula: velocidade = diâmetro do halo de crescimento / n° de dias de crescimento. O cálculo foi realizado no dia em que foi observada a paralisação do crescimento do patógeno.

Para o cálculo da área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), utilizou-se a seguinte fórmula: AACCM = $((y_i + y_{i+1})/2) \cdot d_i$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas e d_i o intervalo entre as avaliações.

Para todos os testes o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANAVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5%, utilizando o software SISVAR, versão 5.1 (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *Trichoderma* receberam código de identificação conforme segue: TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4 e TLB12 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14 e TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*).

Pareamento de culturas - confronto direto

O confronto direto tem sido considerado um ensaio *in vitro* útil e viável para identificar isolados com potencial de biocontrole para diversos fitopatógenos (HERMOSA et al., 2000).

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram rápido crescimento micelial e, com apenas cinco dias de incubação, já era possível observar que alguns isolados causaram inibição no desenvolvimento de *Macrophomina phaseolina*. Os efeitos dos tratamentos foram estatisticamente diferentes pelo teste de Scott-Knott.

Bomfim et al. (2010) encontraram resultados semelhantes trabalhando com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. no biocontrole de *Rhizopus stolonifer*. Segundo os autores, com apenas três dias de incubação, os antagonistas já inibiam o desenvolvimento de *R. stolonifer*.

O teste organizou os isolados em três grupos diferentes. Os isolados TI1, TLB2 e TLB3 apresentaram a menor média de notas, 1, podendo ser considerado o grupo de maior eficiência na supressão de *M. phaseolina*, pois os antagonistas cresceram por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno. Esse grupo não diferiu estatisticamente dos isolados TM3, TM4 TLB4, TLB9, TLB15 e TLB17, que também apresentaram uma grande eficiência na supressão de *M. phaseolina*, impedindo quase que totalmente o desenvolvimento do fitopatógeno, pois cresceram por toda a placa de Petri, porém não cresceram sobre o disco do fitopatógeno.

O segundo grupo, composto pelos isolados TM1 e TM2 apresentou médias de notas de 4 e 3,6 respectivamente. Esse grupo pode ser considerado pouco eficiente na supressão de *M. phaseolina*, pois cresceram

mais do que o fitopatígeno, porém ocuparam menos de $\frac{3}{4}$ da placa de Petri.

Os isolados TI2, TI3, TI4, TLB6, TLB12 e TLB14, não apresentaram qualquer inibição no crescimento de *M. phaseolina*. Esse resultado corrobora com o encontrado por Ethur et al. (2005), que ao testarem diferentes isolados de *Trichoderma* sp., encontraram que 11% dos isolados testados não apresentavam inibição no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. Isso demonstra a variabilidade entre os isolados de *Trichoderma* sp.

Segundo Ethur (2006), pela técnica de confrontação direta com isolados de *Trichoderma* sp. pode-se considerar isolados muito eficientes aqueles que apresentarem notas entre 1,0 e 1,5, e eficientes aqueles que apresentarem notas entre 2,0 e 2,5.

Silva et al. (2008) também observaram diferenças entre isolados de *Trichoderma* quanto a capacidade de supressão de *Phytophthora citrophthora*. Segundo os autores os isolados de *Trichoderma stromaticum*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma virens* apresentaram maior antagonismo ao patógeno estudado, sendo que, o antagonismo por hiperparasitismo foi mais pronunciado quando se utilizou o isolado de *T. stromaticum*, enquanto o *Trichoderma harzianum* apresentou menor antagonismo.

Louzada et al. (2009), realizando o teste de pareamento de culturas e utilizando 230 isolados de *Trichoderma* sp, identificaram 50 isolados com potencial de inibição no crescimento micelial de *Fusarium solani* e 111 com potencial de inibição de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Larralde-Corona et al. (2008), em teste utilizando nove isolados de *Trichoderma* sp., constataram diferença na capacidade dos isolados em prevenir o crescimento micelial de *M. phaseolina*. Enquanto *T. atroviride*, *T. koningiopsis* e *T. harzianum* apresentaram um bom desempenho de parasitismo a *M. phaseolina*, *T. longibrachiatum* exibiu um comportamento parasitário relativamente fraco.

Segundo Dennis e Webster (1971) e Melo (1996), citados por Silva et al. (2008), e Vazquez-Garcidueñas et al. (1998), a capacidade do *Trichoderma* sp. em inibir o desenvolvimento de outros fungos é explicado pela produção de antibióticos, tais como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina e enzimas como, quitinase, β -1,3-glucanase, celulase e hemicelulase. Como o fungo *M. phaseolina* pertence à divisão Ascomycota e possui a parede celular composta por quitina e β -1,3-glucana, possivelmente o seu desenvolvimento é inibido pela produção de antibióticos ou por quitinases e β -1,3-glucanases.

Compostos voláteis

Influência no crescimento micelial

Pelo teste dos compostos voláteis foi possível verificar a produção de metabólitos voláteis dos diferentes isolados de *Trichoderma* sp. resultando em inibição no desenvolvimento micelial do fitopatígeno (Tabela 2).

Em relação à velocidade de crescimento micelial, somente um isolado (TI4) não diferiu da testemunha. Os

demais foram organizados em três grupos distintos, sendo o isolado TLB12 o mais eficiente na redução do crescimento micelial do patógeno.

Em relação a variável AACCM, todos os isolados testados diferiram estatisticamente da testemunha, demonstrando que de alguma forma todos apresentaram uma produção de metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial. Os isolados TM2 e TLB12 foram os que apresentaram menor valor de AACCM. Essa variável explica o comportamento do crescimento micelial do patógeno durante todo o experimento.

Com exceção dos isolados TM2 e TLB12, os demais isolados apesar de produzirem metabólitos capazes de inibir o crescimento inicial do fitopatígeno, apresentaram instabilidade metabólica, pois, após alguns dias ocorreu a retomada do crescimento micelial de *M. phaseolina*.

Bomfim et al. (2010) também verificaram a produção de metabólitos voláteis de diferentes isolados de *Trichoderma* sp. capazes de inibir o desenvolvimento micelial de *R. stolonifer*. Segundo os autores, *T. viride* e *T. harzianum* produziram notável efeito fungistático sobre o patógeno, sendo que *T. viride* inibiu completamente o crescimento de *R. stolonifer*. *T. stromaticum* e *T. virens* produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento do fitopatígeno, porém não foram capazes de manter essa inibição.

A capacidade de inibição do crescimento micelial pelos diferentes isolados testados variou de 0,6 a 23,1%. O isolado TLB12 foi o tratamento que mais apresentou capacidade de inibição (23,1%), seguido pelos isolados TM2, TLB2, TLB15 e TLB17, que apresentaram inibição variando de 12,5 a 15,4%.

Carvalho filho et al. (2008) verificaram diferentes respostas de isolados de *Trichoderma* sp. na inibição micelial de *Cylindrocadium scoparium*. Segundo os autores os compostos voláteis dos isolados utilizados inibiram de 11% a 40% no crescimento micelial do fitopatígeno comparado com a testemunha.

Lobo Junior e Abreu (2000), analisando a inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp. em diferentes temperaturas, descreveram que todos os isolados utilizados no ensaio foram capazes de inibir o crescimento do patógeno, porém a interação entre os isolados e temperatura do ensaio foi altamente significativa. Segundo os autores, a seleção de antagonistas levando-se em consideração a produção de compostos voláteis, deve ser realizada na faixa ótima de temperatura para o desenvolvimento do patógeno.

Zancan et al. (2012), avaliando o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* na presença de *Trichoderma harzianum*, constataram que o antagonista utilizado em diferentes doses foi capaz de inibir em mais de 77% o crescimento micelial do patógeno. Segundo os autores conforme a dose aumentava maior era a redução no desenvolvimento do fungo patogênico.

Segundo Brotman et al. (2010), a produção de compostos voláteis pelas diferentes espécies de

Trichoderma sp. é considerado um fator importante no controle de fitopatógenos.

Influência na produção de microescleródios

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. utilizados no teste dos compostos voláteis foram capazes de inibir a produção de microescleródios do fitopatógeno (Tabela 3).

TABELA 2. Velocidade do crescimento micelial, crescimento total (área abaixo da curva de crescimento micelial – AACCM) e % de inibição de *Macrophomina phaseolina* submetidos a produção de compostos voláteis por diferentes isolados de *Trichoderma* sp.

Isolados	Espécie	Velocidade (cm dia ⁻¹)	AACCM	% de inibição
TI1	<i>T. virens</i>	1,38 c	19,9 b	8,2
TI2	<i>T. harzianum</i>	1,48 d	20,3 b	1,3
TI3	<i>T. virens</i>	1,48 d	20,9 c	1,5
TM1	<i>T. virens</i>	1,49 d	21,0 c	0,6
TM2	<i>T. virens</i>	1,28 b	19,2 a	14,6
TM3	<i>T. virens</i>	1,36 c	19,7 b	9,2
TI4	<i>T. harzianum</i>	1,45 d	21,4 c	3,7
TM4	<i>T. virens</i>	1,37 c	20,2 b	8,8
TLB2	<i>T. harzianum</i>	1,31 b	20,9 c	12,5
TLB3	<i>T. harzianum</i>	1,36 c	21,3 c	9,6
TLB4	<i>T. harzianum</i>	1,38 c	21,3 c	7,8
TLB6	<i>T. asperellum</i>	1,39 c	20,6 b	7,7
TLB9	<i>T. virens</i>	1,35 c	21,5 c	10,0
TLB12	<i>T. harzianum</i>	1,15 a	19,0 a	23,1
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	1,42 c	21,3 c	5,2
TLB15	<i>T. virens</i>	1,30 b	20,3 b	13,7
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	1,27 b	20,4 b	15,4
Testemunha		1,50 d	23,7 d	
CV (%)		5,33	4,31	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

TABELA 3. Produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* submetidos a produção de compostos voláteis por diferentes isolados de *Trichoderma* sp.

Isolados	Espécie	Velocidade (cm dia ⁻¹)	Diâmetro de produção de microescleródios	% inibição
TI1	<i>T. virens</i>	0,67 a	4,05 a	55,00
TI2	<i>T. harzianum</i>	0,91 b	5,45 b	39,46
TI3	<i>T. virens</i>	0,79 b	4,74 b	47,34
TM1	<i>T. virens</i>	0,86 b	5,16 b	42,68
TM2	<i>T. virens</i>	0,67 a	4,03 a	55,20
TM3	<i>T. virens</i>	0,67 a	3,99 a	55,67
TI4	<i>T. harzianum</i>	0,85 b	5,10 b	43,32
TM4	<i>T. virens</i>	0,73 a	4,39 a	51,22
TLB2	<i>T. harzianum</i>	0,69 a	4,13 a	54,12
TLB3	<i>T. harzianum</i>	0,81 b	4,87 b	45,89
TLB4	<i>T. harzianum</i>	0,80 b	4,81 b	46,56
TLB6	<i>T. asperellum</i>	0,91 b	5,44 b	39,54
TLB9	<i>T. virens</i>	0,82 b	4,95 b	44,98
TLB12	<i>T. harzianum</i>	0,57 a	3,43 a	61,88
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	0,80 b	4,79 b	46,78
TLB15	<i>T. virens</i>	0,77 b	4,60 b	48,90
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	0,74 a	4,40 a	51,12
Testemunha		1,50 c	9,00 c	
CV (%)		15,10	15,04	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Em relação à velocidade de crescimento micelial, todos os isolados diferiram da testemunha. Os isolados foram organizados em dois grupos distintos, sendo os isolados TI1, TM2, TM3, TM4, TLB2, TLB12 e TLB17 os mais eficientes na redução do crescimento micelial do patógeno.

A capacidade de inibição na produção de microescleródios pelos diferentes isolados avaliados no

sexto dia após o início do teste variou de 39% a 61%, demonstrando uma grande capacidade dos isolados em prejudicar a produção de estruturas de sobrevivência do patógeno (Figura 1). Segundo Mello (1996), isolados de *Trichoderma* sp. são eficientes no controle de inúmeros fitopatógenos, principalmente aqueles com estruturas de resistência.

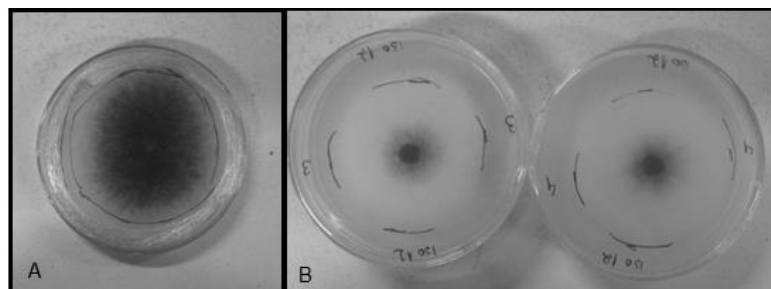


FIGURA 1 - Efeito dos metabólitos voláteis produzidos por diferentes isolados de *Trichoderma* na produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*. A – três dias após o início do teste, testemunha. B – três dias após o início do teste, isolado TBL12.

TABELA 4. Crescimento total (área abaixo da curva de crescimento micelial - AACCM) e % de inibição de *Macrophomina phaseolina* submetidos a produção de compostos não voláteis por diferentes isolados de *Trichoderma* sp.

Isolados	Espécie	AACCM	Inibição (%)
TI1	<i>T. virens</i>	10,48 c	36,7
TI2	<i>T. harzianum</i>	1,48 a	91,1
TI3	<i>T. virens</i>	9,83 c	40,6
TM2	<i>T. virens</i>	10,78 c	34,9
TM3	<i>T. virens</i>	0,03 a	99,8
TM4	<i>T. virens</i>	0,68 a	95,9
TLB2	<i>T. harzianum</i>	9,68 c	41,5
TLB3	<i>T. harzianum</i>	9,65 c	41,7
TLB4	<i>T. harzianum</i>	10,45 c	36,9
TLB6	<i>T. asperellum</i>	1,75 a	89,4
TLB9	<i>T. virens</i>	1,70 a	89,7
TLB12	<i>T. harzianum</i>	10,83 c	34,6
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	1,45 a	91,2
TLB15	<i>T. virens</i>	7,48 b	54,8
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	1,20 a	92,7
Testemunha		16,55 d	-
CV (%)		16,06	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Remuska e Dalla Pria (2007), trabalhando com diferentes isolados de *Trichoderma* sp., encontraram resultados diferentes no manejo de *Sclerotium rolfsii*. Segundo os autores, *Trichoderma* sp. foi capaz de inibir o crescimento micelial, porém não impediu que o fitopatógeno produzisse escleródios.

Kunieda-Alonso et al. (2005) encontraram redução significativa na sobrevivência de escleródios de *Rhizoctonia* sp. no solo tratados com suspensão conidial de *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma inhamatum*. Segundo os autores, ao longo de doze meses de avaliação a

sobrevivência dos escleródios decresceu progressivamente, atingindo 59% de inviabilidade ao final do primeiro mês.

Zancan et al. (2012), avaliando produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* constataram que *Trichoderma harzianum* provocou a inibição do processo de formação dos escleródios in vitro, porém não afetou a germinação dos escleródios formados.

Segundo Larralde-Corona et al. (2008), *Trichoderma* sp. são capazes de degradar micélio e microescleródios de *M. phaseolina*, se enrolando em torno das hifas do patógeno através da formação de estruturas em formato de ganchos.

Produção de compostos não voláteis

Foi possível verificar a inibição no desenvolvimento micelial de *Macrophomina phaseolina* a partir da produção de metabólitos não voláteis de todos isolados de *Trichoderma* sp. estudados neste ensaio (Tabela 4). Em relação a variável AACCM (área abaixo da curva de crescimento micelial), que explica o comportamento do crescimento micelial do patógeno durante todo o experimento, todos os isolados testados diferiram estatisticamente da testemunha, demonstrando que de alguma forma todos apresentaram uma produção de metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial. Os isolados TI2, TM3, TM4 e TLB6, TLB9, TLB14 e TLB17 foram os que apresentaram menor valor de AACCM, inibindo o crescimento igual ou superior a 89%.

Os demais tratamentos reduziram entre 34% e 55%, menos efetivo, porém, significativo em relação ao controle.

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais os diferentes isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram variação na capacidade de inibição do crescimento do patógeno. Os isolados TI1, TM2, TM3, TM4, TLB2, TLB3, TLB15 e TLB17 foram os que apresentaram maior antagonismo ao fungo *M. phaseolina*, apresentando potencial para o controle biológico deste patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASCO Dossiê – **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. 2ª Parte. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012. 135 p.
- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p.53-90.
- ALMEIDA, A.M.R.; ABDELNOOR, R.V.; ARRABAL ARIAS, C.A.; CARVALHO, V.P.; JACOUB FILHO, D.S. MARIN, S.R.R.; BENATO, L.C.; PINTO, M.C.; CARVALHO, C.G.P. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.279-285, 2003a.
- ALMEIDA, A.M.R.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; TORRES, E.; FARIAS, J.R.B.; BENATO, L.C.; PINTO, M.C.; VALENTIM, N. Progress of soybean charcoal rot under tillage and no-tillage systems in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.131-135, 2003b.
- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F. V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIM, J.A.M.; REZENDE, A.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. Piracicaba: Ceres, 2005. v.2, p.569-588.
- ARGUMEDO-DELIRA, R.; ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; PEÑA-CABRIALES, J.J. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, Toluca, v.24, n.4, p.257-269, 2009.
- BABU, B.K.; REDDY, S.S.; YADAY, M.K.; SUKUMAR, M.; MISHRA, V. SAXENA, A.K.; ARORA, D.K. Genetic diversity of *Macrophomina phaseolina* isolates from certain agro-climatic regions of India by using RAPD markers. **Indian Journal of Microbiol**, New Delhi, v.50, n.2, p.199-204, 2010.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, n.4, p.379-382, 1982.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M.A.B. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. In: VENEZON, M.; PAULA JUNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2005. p.163-183.
- BOMFIM, M.P.; SÃO JOSPE, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagonística *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.1, p.61-67, 2010.
- BROTTMAN, Y.; KAPUGANTI, J.G.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, Massachusetts, v.20, n.9, p.390-391, 2010.
- CARVALHO FILHO, M.R.; MENÉZES, J.E.; MELLO, S.C.M.; SANTOS, R.P. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da Mancha Foliar do Eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento EMBRAPA**. Brasília, v.1, n.225, 2008.
- DENNI, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, Sheffield, v.57, p.363-369, 1971.
- ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A.C.F.; STEFANELLO, D.R.; ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.127-133, 2005.
- ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A.F.; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v.30, p.135-165, 2000.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, London, v.2, p.43-56, 2004.
- HERMOSA, M.R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E.A.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.1890-1898, 2000.
- KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A. Sobrevida de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.164-168, 2005.
- LARRALDE-CORONA, C.P.; SANTIAGO-MENA, M.R.; SIFUENTES-RINCÓN, A.M.; RODRÍGUEZ-LUNA, I.C.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A.; SHIRAI, K.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v.80, p.167-177, 2008.
- LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.521-526, 2000.
- LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAUNA, L.M. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biotaneotópica**, São Paulo, v.9, n.3, p.145-149, 2009.
- MELLO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.261-295, 1996.
- MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MUNISSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "*in vitro*". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, n.2, p.57-66, 1976.
- REMUSKA, A.C.; DELLA PRA, M. Efeito de *Bacillus truringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publicação UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharia**, Ponta Grossa, v.13, n.3, p.31-36, 2007.

- RODRIGUES, Johnathan. *Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum* – feijoeiro. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- SILVA, K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; BOMFIM, M.P.; SILVA, D.S.; SÃO JOSÉ, A.R.; BENETT, C.G.S. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.4, p.749-754, 2008.
- SMITH, G.S.; WYLLIE, T.D. Charcoal rot. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**, 4th edition. The American Phytopathological Society, Minnesota, 1999. p. 29-31.
- SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉIA, M.M. Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p.1-29, 2004.
- STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.16, p.265-304, 2008.
- VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS, S.; LEAL-MORALES, C.A.; HERRERA-ESTRELLA, A. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agente *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.4, p.1442-1446, 1998.
- ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; SOUZA, B.F.M.; MATOS, C.S.M. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.5, p.782-789, 2012.