

PALOMA BRANDÃO DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO CULTIVO PAREADO DE *Trichoderma* spp NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE MOFO BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*)**

MONTE CARMELO
2018

PALOMA BRANDÃO DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO CULTIVO PAREADO DE *Trichoderma spp* NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE MOFO BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*)**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Fundação Carmelitana
Mário Palmério como requisito parcial
para obtenção do título de Bióloga.

Orientadora: Profa. Me. Jessica Borges de Oliveira.

MONTE CARMELO
2018

AVALIAÇÃO DO CULTIVO PAREADO DE *Trichoderma* spp NO CONTROLE BIOLÓGICO DE MOFO BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*)

Paloma Brandão de Sousa¹
Jessica Borges de Oliveira²

RESUMO: O controle biológico tem sido uma alternativa utilizada no manejo de doenças na cultura da soja. O trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de inibição de *Trichoderma* spp. na incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*. O experimento foi realizado no laboratório de microbiologia da FUCAMP. Foram conduzidos ensaios envolvendo a técnica de cultivo pareado, onde discos de micélio do patógeno foram colocados em um dos lados da placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), e do outro lado foram colocados os isolados de *Trichoderma* spp. Após finalizadas as placas foram incubadas em BOD a 25 °C e posteriormente 15 dias após o semeio foi realizada a avaliação do crescimento por meio da determinação do diâmetro do crescimento micelial em comparação com a testemunha. No experimento de cultivo pareado é possível inferir que os quatro isolados de *Trichoderma* spp reduziram o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* spp entre 84,37% e 100,0%.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico; Fungo; Mofo branco.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja está entre as plantas de importância econômica no Brasil, na safra 2017/2018 o país produziu 117 milhões de toneladas em 35,1 milhões de hectares (CONAB, 2018).

Na soja o período considerado mais vulnerável para a infecção de *S. sclerotiorum* é durante a fase R2 (floração plena) até o início da fase R5 (formação dos grãos), o desenvolvimento desta doença obtém progresso em condições de alta umidade na qual não existem espécies de soja que resistem ao patógeno (HENNING, 2009). É estimado que em mais de 20% da área que é utilizada para o cultivo de soja é afetada pelo fungo *S. sclerotiorum* (MEYER et al., 2016).

O mofo branco (*Sclerotinia Sclerotiorum*) conhecido como podridão de-esclerotínia, está entre as doenças que apresentam um importante fator de restrição à produção, esse fungo produz escleródios que proporcionam maior resistência, sobrevivendo no solo com maior facilidade durante anos (JACCOUD FILHO et al., 2017).

¹ Graduanda em Biologia pela Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), Monte Carmelo/MG. E-mail: palomabrandao97@gmail.com

² Professora Orientadora, Ciências Biológica, Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), Monte Carmelo/MG. E-mail: jeoliveiraborges@gmail.com

Segundo Michereff (2001), o controle biológico de doenças em plantas consiste na interação entre hospedeiro, patógeno e alguns não patógenos que habitam o sítio de infecção, e os mesmos podem limitar a atividade do patógeno e/ou aumentar a resistência do hospedeiro. A utilização de agentes no controle biológico contra patógenos de plantas tem-se mostrado bastante eficaz, podendo reduzir o uso de pesticidas, possibilitando a conservação dos recursos naturais, menor impacto ambiental e evitando o rompimento do equilíbrio ecológico (SILVA ; MELLO, 2007).

Os agentes biológicos são capazes de estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema, pesquisadores buscam micro-organismos com potencial biológico objetivando reduzir o uso de fungicidas sem comprometer a produtividade agrícola (ÁVILA et al, 2005). A utilização do controle biológico pode ser justificada por representar um passo na direção de uma produção mais limpa e sustentável (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Os programas referentes ao controle biológico devem priorizar seleção de micro-organismos potencialmente antagônicos em relação ao fitopatógeno alvo (MELLO et al., 2007). Dentre os isolados que têm apresentado bons resultados no controle biológico estão fungos do gênero *Trichoderma* que são reconhecidas como organismos controladores presentes no solo, devido ao fato de estarem envolvidos em processos de decomposição, na reciclagem de nutrientes (SILVA; MELLO, 2007).

O *Trichoderma* é um dos antagonistas de fungos mais estudados, sendo microrganismos de vida livre, altamente interativos no solo, nas superfícies radiculares e no interior dos tecidos vegetais, (MACHADO et al., 2012) além disso auxilia a solubilizar os nutrientes na rizosfera, o que facilita a absorção pelas raízes, por este motivo tem despertado interesse dos pesquisadores (HARMAN et al., 2012).

A importância deste trabalho é atribuída à necessidade de gerar menos custos aos produtores, obter uma agricultura sustentável com a utilização de menos produtos químicos, assim produzindo alimentos de qualidade para o consumo, destacando a cultura da soja que possui grande importância econômica no Brasil. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de inibição de *Trichoderma* spp na incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do Patógeno

Os isolados de *Sclerotinia Sclerotiorum* foram obtidos da coleção do laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia. Antes da realização dos experimentos,

os escleródios foram repicados no laboratório de microbiologia da Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP) em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), onde as mesmas foram colocadas em câmara de incubação do tipo BOD a 25 °C.

2.2 Obtenção do antagonista

Os isolados de *Trichoderma* spp foram adquiridos através de produtos comerciais, em que foram colonizados em placa de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), e mantido em câmara de incubação do tipo BOD, a partir destas placas os fungos foram para a formação das colônias.

As cepas comerciais do presente estudo foram: Tratamento 1: *Trichoderma harzianum* cepa CCT 7589 (StimuControl; Simbiose, Cruz Alta, RS, Brasil), Tratamento 2: *Trichoderma asperellum* URM 5911 (Quality WG; Laboratório de Biocontrole Farroupilha Ltda, Patos de Minas, MG, Brasil), Tratamento 3: *Trichoderma harzianum* T-22 (Trianum; Koppert Biological Systems, Piracicaba, SP, Brasil), Tratamento 4: *Trichoderma harzianum* ESALQ 1306 (Trichodermil; Koppert Biological Systems, Piracicaba, SP, Brasil).

2.3 Experimento 'in vitro' – Cultivo Pareado

Para estudar o efeito antagônico dos isolados de *Trichoderma* spp no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, conforme descrito por Dennis e Webster (1971). Para isso, escleródios de *S. sclerotiorum* foram transferidos, com o auxílio de pinça, para placas de Petri contendo BDA e posicionados a 1 cm da borda da placa e posteriormente o fungo foi repicado no lado oposto da placa, seguida de incubação em BOD a 25°C. A testemunha foi constituída de placas contendo apenas o fitopatógeno. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. O potencial de inibição dos isolados foi avaliado aos 15 dias após o semeio nas placas, com medições do crescimento micelial do fitopatógeno.

A avaliação do crescimento foi feita por meio da determinação do diâmetro do crescimento micelial em comparação com a testemunha, utilizando uma régua. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, foi aplicada a fórmula: % inibição = $[(cr_{test} - cr_{trat}) / cr_{test}] \times 100$, onde: cr_{test} = crescimento radial testemunha; cr_{trat} = crescimento radial tratamento, segundo MENTEN et al. (1976).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. Os dados obtidos foram

submetidos à análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade) e os tratamentos foram comparados por meio do teste de Scott-Knott, com nível de 5% de probabilidade, com o uso do pacote estatístico STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro isolados de fungos testados reduziram o crescimento micelial do patógeno entre 84,37% e 100,0%. Os fungos que mostraram maior potencial de inibição foram: *Trichoderma harzianum* cepa CCT 7589; *T. harzianum* ESALQ 1306; *T. harzianum* T-22, e *T. asperellum* URM 5911, com porcentagens de inibição de 100,00%, 96,87%, 90, 62% e 84, 37%, respectivamente em relação à testemunha. Estes isolados não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 1).

Com este trabalho foi possível obter resultados significativos do potencial desses isolados de *Trichoderma* spp contra o patógeno *S. sclerotiorum* que ataca grandes culturas de importância econômica, onde todos os isolados se mostraram altamente efetivos in vitro. A avaliação do potencial antagonico in vitro de *Trichoderma* spp serve como uma seleção preliminar, podendo observar o comportamento desses micro-organismos quanto à capacidade de adaptação, crescimento e reprodução, e vale ressaltar que é uma avaliação prática (POLETTI, 2010).

Segundo Harman et al., (2012) o mecanismo de ação dos organismos é essencial no entendimento do fenômeno do biocontrole. Muitas espécies de *Trichoderma* possuem a capacidade de produzir metabólitos tóxicos, tais como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir propágulos de fungos fitopatogênicos, o fungo em cultura pareada pode-se destacar por hiperparasitismo, competição por espaço e pode atuar por antibiose, devido a produção de algumas substâncias, como a trichodermina e a dermadina (MACHADO et al., 2012).

TABELA 1. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* através da utilização de *Trichoderma* spp aos 15 dias, 2018.

Tratamentos	Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial de <i>S. sclerotiorum</i>
Testemunha (T0)	0 b
Tratamento 1 (T1)	100,00 a
Tratamento 2 (T2)	84,37 a
Tratamento 3 (T3)	90,62 a
Tratamento 4 (T4)	96,87 a

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

Espécies de *Trichoderma* são considerados parasitas de muitos fitopatógenos, dependendo do isolado e sua capacidade de adaptação às condições bióticas e abióticas, o nível de controle pode variar. Esses fungos atuam protegendo o sistema radicular das plantas por mecanismos como parasitismo, antibiose e indução de resistência (HARMAN et al., 2012).

Delgado et al. (2007), classificaram onze isolados de *Trichoderma* spp com potencial de *S. sclerotiorum*, os autores ainda afirmaram que a técnica de confrontação direta de cultura é eficaz para o antagonista *Trichoderma* spp contra *S. sclerotiorum*, onde os mecanismos de parasitismo, competição e antibiose são suas ações de antagonismo, que podem ou não estar associadas.

Corroborando com esse estudo, Louzada et al. (2009) identificaram cerca de 111 isolados de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum*, pelo teste de pareamento de culturas. É relevante a capacidade de produção de antibióticos por antagonistas, que conferem uma interferência direta no desenvolvimento do patógeno, além da competição por espaço e nutrientes, contudo, Louzada et al. (2009) afirma que os fungos do gênero *Trichoderma* podem possuir outros mecanismo de antagonismo.

Experimentos realizados por Ethur et al., (2005) demonstraram que isolados de *Trichoderma* spp apresentaram maior antagonismo por antibiose ao *S. sclerotiorum* isolado de tomateiro, alface e fumo no confronto direto variando de 86% a 94% de inibição, assim confirmando os resultados encontrados nesta pesquisa.

Oliveira et al. (2008) verificaram isolados de *Trichoderma* spp promissores sobre *S. sclerotiorum*, e ainda ressaltaram que a redução de crescimento de *S. sclerotiorum* pode ser atribuída à competição por espaço e por nutrientes presentes no meio de cultura, como também pela liberação de substâncias tóxicas. Este efeito também foi exposto por Ávila et al. (2005), avaliando isolados de *Trichoderma* spp contra *Sclerotium. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

É altamente desejável a utilização de *Trichoderma*, pois, pode-se reduzir ou o eliminar o uso de fertilizantes químicos, que do ponto de vista da produção agrícola sustentável causam prejuízos ao meio ambiente, além de apresentarem capacidade de produzir antibióticos e enzimas, e pela produção de metabólitos com as duas propriedades: controle de patógenos e promoção do crescimento inicial de plantas (MACHADO et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que as cepas de *Trichoderma* spp utilizadas no experimento de cultivo pareado apresentaram resultado favorável contra o patógeno.

Pode inferir que os isolados de *Trichoderma* spp são antagonistas favoráveis, portanto, trabalhos em campo devem ser realizados para corroborar o potencial antagonístico do fungo contra o patógeno.

REFERÊNCIAS

- ÁVILA, Z.R.; CARVALHO, S.S.; BRAÚNA, L.M.; GOMES, D.M.P.A.; MELLO, S.C.M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum*.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 30p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 117).
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira – grãos: maio/2018 - oitavo levantamento. Brasília: Conab, v.5, n.8, 2018. 140 p.
- DELGADO, G.V., MARTINS, I., MENÉZES, J. E., MACEDO, M. A. & MELLO, S. C. M. 2007. **Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. in vitro.** In: Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília: 214.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 359-363, 1971.
- ETHUR, L. Z., BLUME, E., MUNIZ, M., DA SILVA, A. C. F., STEFANELO, D. R. & DA ROCHA, E. K. 2005. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.127-133, 2005.
- HARMAN, G. E.; HERRERA, A. H. E.; HORWITZ, B. A.; LORITO, M. Special issue: *Trichoderma* – from Basic Biology to Biotechnology **Microbiology**, v.158, n.1, p.01-02, 2012.
- HENNING, A. A. Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill). Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2009.
- JACCOUD FILHO, D.S.; NASSER, L.C.B.; HENNENBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; JULIATTI, F.C. Mofo-branco: Introdução, histórico, situação atual e perspectivas. In: JACCOUD FILHO, D.S.; HENNENBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G. (eds.). **Mofo branco**. Ponta Grossa: Todapalavra, 2017. p. 29-73.
- LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v.9, n.3, p.145-149, 2009.
- MACHADO, D.F.M.; PARZIANELLO, R. F.; SILVA, A.C.F.; ANTONIOLLI, Z.I. *Trichoderma* no Brasil: O Fungo e Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012..

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 rolfsi* Sacc. **Fitosanidad, Havana**, v.11, p.1-11, 2007.

MENTEN, J.O.M.; MINUSSI, C.C.; 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.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. **Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo branco na cultura da soja - safras 2012 a 2015**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 46 p. (Embrapa Soja, Documentos, 368)

MICHEREFF, S.J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Universidade Federal Rural de Pernambuco departamento de agronomia are de fitossanidade. Recife 2001, p.123-133 .

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. Cap. 1, 7-14.

OLIVEIRA, T.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. Avaliação da atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Comunicado Técnico**, Brasília, DF, n.177, ago., 2008.

POLETTI, I. 2010. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate/podridão-de-raízes**. 2010. 97 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M. **Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

STATSOFT, Inc. Statistica for Windows (computer program manual). Tulsa, OK: Statsoft Inc. STEWART, A.; MCLEAN, K.L. Biological control of onion white rot. In: CHINCHOLKAR, S.B.; MUKERJI, K.G. (Ed.). **Biological Control of Plant Diseases**. New York: The Haworth Press, 2007. p. 123-148. 2004.

ANEXO – LISTA DE FIGURAS

Experimento 'in vitro' – Cultivo Pareado

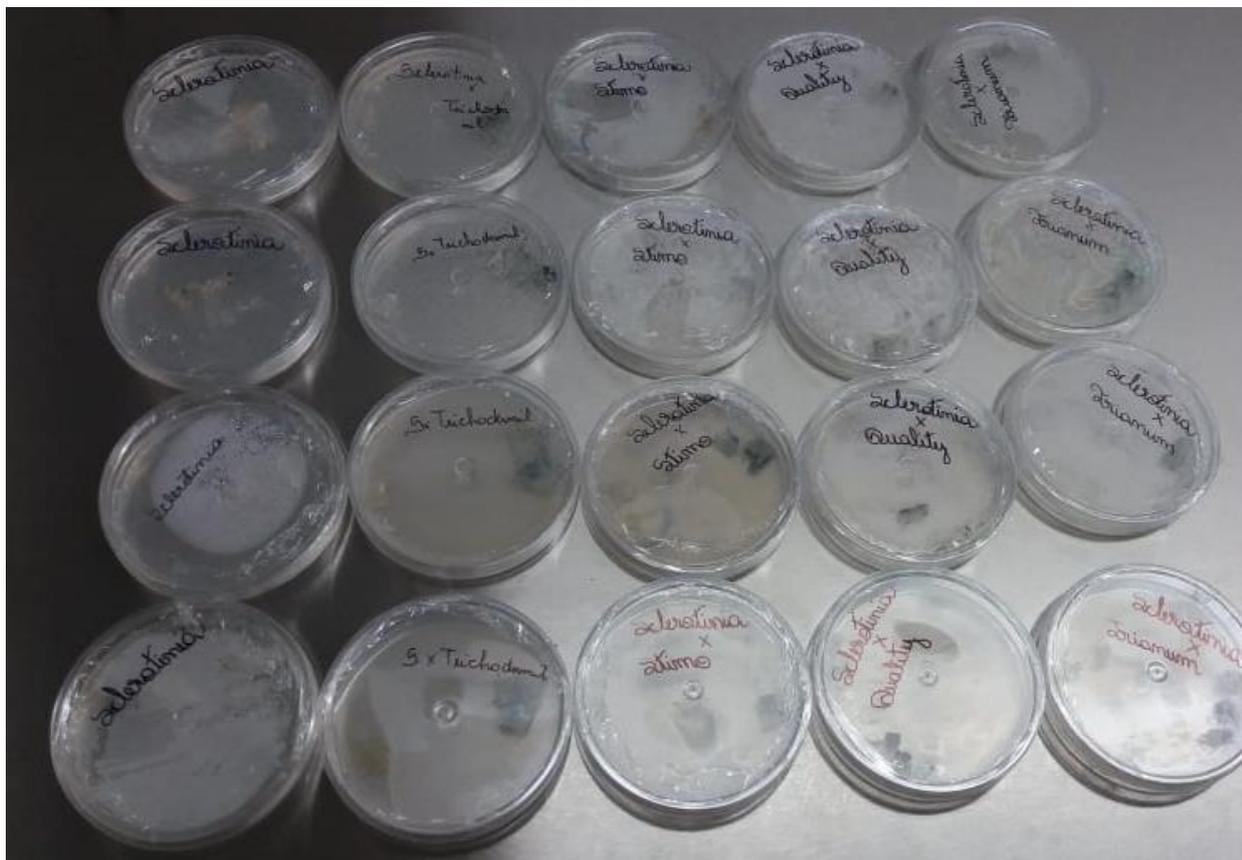


Figura 1 Experimento montado.



Figura 2 Isolados de *Trichoderma* spp apresentando antagonismo à *S. sclerotiorum* spp