

IDENTIFICAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. ARMAZENADOS E NATIVOS NO BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*¹

GERARDA BEATRIZ PINTO DA SILVA^{2*}, LEISE INÊS HECKLER³, RICARDO FELICIANO DOS SANTOS⁴,
MIRIA ROSA DURIGON⁵, ELENA BLUME³

RESUMO - O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é responsável por perdas significativas na produção de alface. Por se tratar de um fungo habitante do solo seu manejo é dificultado, sendo uma alternativa o uso do controle biológico utilizando espécies do gênero *Trichoderma*. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram identificar as espécies *Trichoderma* spp. nativas presentes em solo com (CP) e sem mofo-branco (SP), avaliar a velocidade de crescimento e o antagonismo *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* spp. à *S. sclerotiorum* e verificar o potencial de biocontrole proporcionado por *Trichoderma* spp. microbiolizado em sementes de alface, cultivadas em substrato infestado com *S. sclerotiorum*. Foram utilizados isolados de *Trichoderma* spp. oriundos de áreas com e sem histórico de mofo-branco ou armazenados em água. Nos ensaios *in vitro* foram avaliados a taxa de crescimento micelial e a esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp. e controle de *Trichoderma* spp. versus *S. sclerotiorum*. Para o ensaio *in vivo* sementes de alface foram microbiolizadas com *Trichoderma* spp. e o substrato infestado com *S. sclerotiorum*. Os isolados nativos de *Trichoderma* identificados pertencem às espécies *T. koningiopsis* e *T. asperellum*. Os isolados CP apresentaram maior taxa de crescimento micelial quando comparado aos SP e aos armazenados, enquanto que os isolados armazenados apresentaram melhores respostas na confrontação direta. A aplicação de *Trichoderma* spp. promoveu o crescimento de plântulas de alface mais vigorosas quando comparadas à testemunha, assim como um bom desenvolvimento das plântulas na presença do patógeno.

Palavras-chave: Mofo-branco. Controle biológico. *Lactuca sativa* L.

IDENTIFICATION AND UTILIZATION OF *Trichoderma* spp. STORED AND NATIVE IN *Sclerotinia sclerotiorum* BIOCONTROL

ABSTRACT - The fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, handles significant losses in lettuce production. Being a soil borne fungus, its management is difficult, and an alternative is the use of biological control using species of the *Trichoderma* genus. Thus, the objectives of this study were to identify native species of *Trichoderma* spp. presents in the soil with (CP) and without white mold (SP), evaluate the growth rate and *in vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against *S. sclerotiorum* and to verify the biocontrol potential of *Trichoderma* spp. microbiolized lettuce seeds, growing in substrate infested with *S. sclerotiorum*. *Trichoderma* spp. isolates were obtained from areas with and without history of white mold or stored in water. Mycelial growth rate and sporulation of the *Trichoderma* spp. isolates and control of *Trichoderma* spp. versus *S. sclerotiorum* in the *in vitro* essays. For their *in vivo* essay, lettuce seeds were microbiolized with *Trichoderma* spp. and the substrate was infested with *S. sclerotiorum*. The native isolates of *Trichoderma* identified belong to *T. koningiopsis* and *T. asperellum* species. The CP isolates had higher mycelial growth rates when compared to the SP isolates and stored while the stored isolates showed better responses in confrontation. The application of *Trichoderma* spp. promoted higher seedlings quality compared to control, as well as good seedlings development in the presence of the pathogen.

Keywords: White mold. Biological control. *Lactuca sativa* L.

*Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 20/04/2014; aceito em 06/06/2015.

Artigo extraído da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

²Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Faculdade de Agronomia, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre(RS), Brasil; gerardabeatriz@gmail.com.

³Departamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria(RS), Brasil; leiseheckler@gmail.com, elenablu@gmail.com.

⁴Departamento de Fitopatologia, Universidade de São Paulo - USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba(SP), Brasil; ricardofelicianodossantos@gmail.com.

⁵Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, FAMV, Universidade de Passo Fundo - UPF, BR 285, São José, 99052-900, Passo Fundo(RS), Brasil; midurigon@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um fitopatógeno habitante do solo que infecta importantes culturas agrícolas no Brasil como, por exemplos, alface, soja, feijão, canola, girassol etc. A rotação de culturas não é um método efetivo de controle, visto que o patógeno possui uma gama de hospedeiros, que aliados à persistência de suas estruturas de resistência no solo dificultam o manejo (KIN et al., 2011). Sabe-se que a alface é a hortaliça folhosa mais consumida pela população brasileira, sendo produzida em todos os estados da federação (SALA; COSTA, 2012). Entretanto, apresenta alta suscetibilidade a diversas doenças fitopatogênicas, em especial a *S. sclerotiorum*, causadora de uma enfermidade popularmente conhecida como mofo-branco (LOPES et al., 2012), devido a presença de um micélio branco de aspecto cotonoso nas plantas infectadas. Em condições de alta umidade e temperaturas amenas os danos causados por *S. sclerotiorum* podem chegar a mais de 50% (CLARKSON et al., 2014), principalmente em viveiros de mudas, onde ocasionam o *damping off* ou tombamento de plântulas.

Devido a falta de cultivares resistentes para muitos hospedeiros, entres eles a alface (CLARKSON et al., 2014) e aos riscos inerentes ao uso de agrotóxicos no consumo dessa hortaliça, muitos produtores têm se interessado pela utilização do controle biológico. Atualmente o gênero *Trichoderma* é o mais estudado e utilizado no controle biológico de patógenos habitantes do solo. Vários mecanismos de ação, como produção de antibióticos voláteis e não-voláteis, competição por espaço e nutrientes, atividade enzimática hidrolítica e parasitismo (BRITO et al., 2014; ABDULLAH et al., 2008) atuam no controle. Estudos recentes apontam que mais de 1100 estirpes de *Trichoderma* spp., obtidas a partir de 75 espécies, são capazes de desempenhar atividade microparasítica contra os patógenos *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *S. sclerotiorum* (DRUZHININA et al., 2011).

A eficácia do uso de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole requer um entendimento aperfeiçoado da ecologia da rizosfera, uma vez que os respectivos fungos são ubíquos e sua colonização é seriamente afetada pela presença de substratos orgânicos no solo (BRITO et al., 2010; ETHUR, 2006). Apesar do uso de *Trichoderma* spp. no controle de doenças existem poucas informações sobre a sobrevivência e a manutenção de sua atividade em condições de armazenamento. Em estudos realizados *in vitro* Garcia-Núñez et al. (2012) relataram que isolados de *Trichoderma* spp. nativos são mais agressivos do que os armazenados. Semelhantemente, testes *in vivo* demonstraram que *T. harzianum* nativos foram mais efetivos no controle de *S. sclerotiorum* do que isolados comerciais armazenados, já que não somente inibiram o crescimento de *S. sclerotiorum*, o que também ocorreu nos comerciais, mas também foram

capazes de parasitá-lo através da penetração e colonização das hifas (ABDULLAH et al., 2008).

O presente estudo teve por objetivo identificar espécies de *Trichoderma* spp. nativas presentes no solo de áreas com e sem histórico de mofo-branco, avaliar o antagonismo *in vitro* de espécies nativas e de isolados armazenados sobre *S. sclerotiorum* e avaliar o desenvolvimento de plântulas de alface microbiolizadas com *Trichoderma* spp. e semeadas em substrato previamente inoculado com *S. sclerotiorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos na Universidade Federal de Santa Maria - UFSM (RS) no período de agosto a outubro de 2012.

Ensaio *in vitro*

Foram realizadas oito coletas de solo em quatro áreas comerciais de Santa Maria (RS), ou seja, duas coletas por área. Quatro amostras de solo foram coletadas em área onde foi constatada a presença de mofo-branco em alface e quatro em áreas de primeiro cultivo de alface, que antes do plantio estavam em pouso e não apresentavam histórico da doença. Raízes de alface com solo aderido foram retiradas com o auxílio de uma pá de corte e, posteriormente, separadas deste. O solo foi acondicionado em sacos plásticos e levado ao laboratório, permanecendo sob refrigeração a 4 °C até ser usado nos ensaios de isolamento de *Trichoderma* spp.

Foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* spp., dos quais quatro estavam armazenados na micoteca da UFSM e o restante obtidos das amostras de solo coletadas. Os quatro isolados armazenados foram UFSMT17 (*Trichoderma aureoviride* Rifai), UFSMT15.1 (*Trichoderma koningiopsis* Samuels, Suárez & Evans), ETSR20 (*T. harzianum*) e TC1.15 (*Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf & Nirenberg). Para a obtenção dos oito isolados nativos de *Trichoderma* spp. foi usado o método de iscas (GHINI; KIMATI, 1989), sendo selecionado um isolado de cada área amostrada.

O isolado de *S. sclerotiorum* foi obtido a partir de escleródio presente em planta de alface infectada com mofo-branco e sua assepsia realizada com álcool 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por um minuto e água destilada e esterilizada. Para o isolamento, o escleródio foi transferido para placa de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de 0,03 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina e incubado a 25 °C, no escuro. Após sete dias foi verificado o crescimento característico do micélio branco do fungo e formação de escleródios. A partir dessa placa foram feitas repicagens do patógeno para serem usadas nos ensaios.

Os 12 isolados de *Trichoderma* spp. e um de

S. sclerotiorum foram avaliados quanto a taxa de crescimento micelial de ambos os fungos e a esporulação apenas de *Trichoderma* spp., em meio de cultura BDA. As medições foram realizadas durante dois dias, mensuradas com o auxílio de um paquímetro digital em dois sentidos perpendiculares marcados no fundo de cada placa para que as medidas sempre fossem no mesmo sentido. Foram utilizadas as médias de duas medidas para calcular a taxa de crescimento micelial em mm.h^{-1} , aplicando-se a fórmula adaptada de Lilly e Barnett (1951), qual seja: C2 é o crescimento após 48 horas; C1 o crescimento após 24 horas; T2 = 48 h; e T1 = 24 h.

$$\text{Taxa de crescimento} = \frac{(C2 - C1)}{(T2 - T1)}$$

Para avaliar o antagonismo de *Trichoderma* spp. contra o patógeno *S. sclerotiorum* os isolados foram repicados e utilizados aos cinco dias de idade. Seguiu-se a metodologia descrita por Ethur (2006), em que um disco de meio de cultura BDA (10 mm \varnothing) contendo micélio do patógeno foi colocado a 0,5 cm da borda das placas de Petri e estas incubadas por 48

h a 20 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h. Decorrido esse período um novo disco de meio de cultura (10 mm \varnothing) contendo micélio de *Trichoderma* spp. foi depositado na extremidade oposta da placa. As placas foram incubadas em câmara BOD com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

As avaliações do confronto direto seguiram duas escalas, uma proposta por Bell et al. (1982) com notas de antagonismo variando de 1 a 5, baseadas em uma análise visual, em que na nota 1 o antagonista cresce e ocupa toda a placa e na nota 5 o patógeno cresce e ocupa toda a placa, e a outra pela escala adaptada de Rodrigues (2010), baseada em um gabarito que é posicionado sob as placas (Figura 1), cujas notas variam de 1 a 7, na qual 1 o antagonista cresce e ocupa toda a placa e 7 o patógeno cresce e ocupa toda a placa. O uso da escala de Rodrigues visa uma maior confiabilidade na obtenção das notas, além de uma maior amplitude na escala de valores, já que se baseia em um gabarito fixo. Para a avaliação da porcentagem de inibição das colônias de *S. sclerotiorum* foram medidas as colônias do patógeno e estimada a porcentagem com base no diâmetro total da placa.

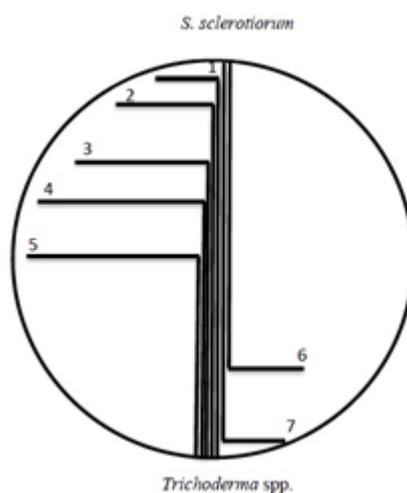


Figura 1. Gabarito da escala adaptada de Rodrigues (2010) com notas variando de 1 a 7. A nota 1 significa a máxima eficiência em colonização de *Trichoderma* spp. e a nota 7 a completa colonização da placa com *Sclerotinia sclerotiorum*. Santa Maria (RS), 2012.

Identificação das espécies de *Trichoderma* spp.

Os oito isolados de *Trichoderma* spp. nativos foram divididos em dois grupos CP (oriundo de áreas com histórico de mofo-branco) e SP (oriundo de áreas sem histórico de mofo-branco), os quais foram encaminhados ao Instituto Biológico de São Paulo para identificação molecular em nível de espécie. Para a identificação foi realizado o sequenciamento, a partir da extração do DNA, amplificação da região ITS e do gene codificador do fator de alongação 1- α . As seqüências obtidas foram comparadas com as depositadas no GenBank, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4.

Preparo de *Trichoderma* spp.

Foi realizado seguindo a metodologia descrita por Ethur (2006), em que 200 g de grãos de arroz seco foram previamente umedecidos com água destilada e depositados em frascos de Erlenmeyer de 350 ml e autoclavados por 40 min duas vezes a 120 °C e 1 atm. Em cada frasco foram acrescentados cinco discos (10 mm) contendo micélio dos isolados de *Trichoderma* spp. separadamente, os quais permaneceram em câmara climatizada a 22 °C com fotoperíodo de 12 h por 15 dias para a colonização completa dos grãos de arroz. Para serem utilizados nos ensaios os grãos já colonizados foram secos na estufa por 48 h em temperatura constante de 37 °C. Em seguida

foram triturados em liquidificador até a obtenção de um pó e armazenados sob refrigeração a 4 °C. Para estimar a concentração de esporos de *Trichoderma* spp. presentes nos pós utilizou-se a câmara de Neubauer com auxílio de microscópio.

Ensaio *in vivo*

Foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* spp., dos quais quatro encontravam-se armazenados na micoteca da UFSM e oito nativos obtidos em ensaios anteriores. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado no esquema fatorial 12 x 2 (isolados de *Trichoderma* spp. x infestação ou não do substrato com *S. sclerotiorum*) mais uma testemunha absoluta. Para a avaliação do potencial de biocontrole de *S. sclerotiorum* em plântulas de alface foi realizado um ensaio utilizando-se bandejas de isopor com 200 células cada e substrato comercial Mec Plant[®]. As bandejas permaneceram em câmara climatizada com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, sendo irrigadas de maneira uniforme diariamente.

Sementes de alface cv. Regina foram microbiolizadas 24 h antes da semeadura, com a formulação de *Trichoderma* spp. em pó com concentração de aproximadamente 2×10^6 esporos.g⁻¹, semeando-se apenas uma semente por célula para não superestimar a concentração do antagonista. Devido a falta de padronização para aplicações de *Trichoderma* spp. em formulações em pó, principalmente em sementes de alface, adotou-se a proporção de 1 g de pó para cada 1 g de sementes. Ambos foram pesados separadamente e colocados juntos em placas de Petri, as quais foram seladas com filme plástico e agitadas por 2 min a fim de uma melhor uniformização de cobertura das sementes, repetindo-se a agitação 3 vezes. As placas contendo as sementes microbiolizadas permaneceram em temperatura ambiente (25 °C) por 24 h até serem utilizadas.

As bandejas utilizadas continham substrato previamente infestado por 48 h com uma suspensão de micélio do patógeno, na proporção de uma placa de Petri contendo *S. sclerotiorum* com cinco dias de idade, para cada bandeja. Foram utilizadas quatro repetições com 25 sementes cada, totalizando 100 sementes por tratamento.

Para determinar o Índice de Velocidade de Emergência (IVE) foram realizadas contagens diárias do número de sementes emergidas e seu valor calculado conforme a fórmula proposta por Brasil (2009). Quando a emergência se estabilizou fora determinada a porcentagem de emergência e, ao final do experimento, determinada a porcentagem de plantas so-

breviventes. As avaliações finais foram realizadas 21 dias após a semeadura e as variáveis analisadas foram comprimento da parte aérea e sistema radicular, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e matéria seca total.

Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise de variância para verificação da significância e realizada a comparação de médias utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Para essas análises foi utilizado o *software* estatístico SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

A partir do sequenciamento do DNA dos isolados foi possível realizar sua identificação em nível de espécie, quais sejam: *Trichoderma koningiopsis* Samuels; Suárez & Evans para SP13 e SP23; *Trichoderma asperellum* Samuels; e Lieckf & Nirenberg para CP11, CP12, CP21, CP22, SP14 e SP24. As espécies identificadas são conhecidas e utilizadas no controle biológico de fitopatógenos habitantes do solo, inclusive para o controle de *S. sclerotiorum* (LOPES et al., 2012; RODRIGUES, 2010). Hoyos-Carvajal et al. (2009), estudando a biodiversidade de 183 isolados de *Trichoderma* spp. em sete países da América do Sul, incluindo o Brasil, observaram que *T. asperellum* foi a espécie encontrada em maior frequência, com 60 isolados, seguida de *T. harzianum* com 49.

As espécies encontradas neste trabalho estão de acordo com Lopes et al. (2012), os quais obtiveram 21 isolados oriundos do Cerrado brasileiro, sendo nove *T. asperellum* (42,86%), sete *T. harzianum* (33,33%), três *Trichoderma tomentosum* Bissett (14,29%), um *T. koningiopsis* (4,76%) e um *Trichoderma erinaceum* (Bissett, Kubicek & Szakacs) (4,76%). A espécie *T. asperellum* pode ser considerada como uma das mais abundantes em solos brasileiros.

Ensaio *in vitro*

De modo geral, os isolados do antagonista tiveram significativamente maior taxa de crescimento micelial do que o fitopatógeno, com exceção do isolado TC1.15 (Figura 2).

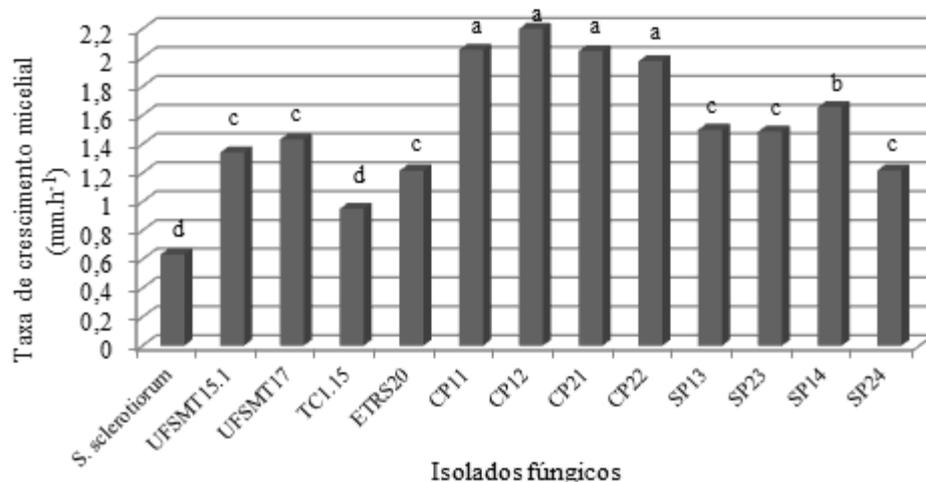


Figura 2. Taxa de crescimento micelial (mm.h⁻¹) de *Sclerotinia sclerotiorum* e de *Trichoderma* spp. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Santa Maria (RS), 2012.

Os isolados pertencentes ao grupo CP mostraram-se estatisticamente superiores aos demais, sugerindo que a convivência com o patógeno em campo acelera a taxa de crescimento micelial de *Trichoderma* spp. *in vitro* e que podem ser bons competidores por espaço e pouco exigentes quanto a nutrientes específicos, visto que foram cultivados meio de cultura BDA. Brito et al. (2010) relataram que isolados armazenados apresentaram crescimento inferior quando comparados aos isolados obtidos de compostos orgânicos, corroborando com os dados deste trabalho, no qual os isolados da micoteca apresentaram as menores taxas de crescimento, recomendando que ocorre decréscimo na viabilidade devido ao armazenamento prolongado.

Os resultados apresentados pelos isolados do grupo SP sugerem que na ausência da doença a taxa

de crescimento de *Trichoderma* spp. é estatisticamente menor do que onde há frequente pressão exercida pelo mofo-branco. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram taxas de crescimento variando de aproximadamente 2,2 a 0,9 mm.h⁻¹ e 0,6 mm.h⁻¹ para o patógeno, superando os valores encontrados por Barakat et al. (2006), que ao utilizarem isolados de diferentes origens obtiveram taxas variando de 1,125 a 0,5 mm.h⁻¹ para *Trichoderma* spp. e 0,17 mm.h⁻¹ para *Sclerotium rolfisii* Sacc.

No teste de confrontação direta (Tabela 1) observou-se que a escala proposta por Rodrigues (2010) foi mais precisa do que a de Bell (1982), uma vez que apresentou um coeficiente de variação menor. Por se tratar de uma escala de avaliação mais objetiva a escala de Rodrigues (2010) presumivelmente permite resultados mais acurados.

Tabela 1. Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo a *Sclerotinia sclerotiorum* segundo as escalas de Bell (1982) e Rodrigues (2010) e porcentagem de inibição de crescimento (%) de *Sclerotinia sclerotiorum*. Santa Maria (RS), 2012.

<i>Trichoderma</i> spp.	Bell (1982)	Rodrigues (2010)	Inibição de <i>S. sclerotiorum</i> (%)
UFSMT15.1	2,0 b ¹	3,2 b	63,03 b
UFSMT17	2,2 b	2,2 b	49,12 c
TC1.15	5,0 a	5,0 a	47,76 c
ETSR20	2,5 b	4,6 a	45,88 c
CP11 ²	4,6 a	4,8 a	37,70 c
CP12	4,2 a	4,2 a	42,63 c
CP21	2,0 b	2,6 b	72,68 a
CP22	3,6 b	4,2 a	55,99 b
SP13 ³	4,6 a	5,2 a	47,76 c
SP23	4,4 a	5,8 a	43,26 c
SP14	4,4 a	5,8 a	48,62 c
SP24	4,4 a	5,8 a	48,62 c
CV (%)	26,66	22,90	17,78

¹Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; ²CP: isolados provenientes de áreas com histórico de mofo-branco; ³SP: isolados provenientes de áreas sem histórico de mofo-branco.

A redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* apresentou diferença significativa para os isolados testados, sendo CP21 o melhor, reduzindo 73% do crescimento micelial do patógeno, seguido de UFSMT15.1 e CP22, com 63 e 56%, respectivamente. Os resultados desse ensaio variaram de 38 a 73%, corroborando com os dados obtidos por Ávila et al. (2005) que conseguiram porcentagem de inibição variando de 30 a 70%. Estudos recentes demonstram que espécies de *Trichoderma* spp. atuam distintamente na inibição de *S. sclerotiorum* (QUALHATO et al., 2013). Segundo Lopes et al. (2012), *T. asperellum* 11/11 e *T. harzianum* ALL-42 apresentaram mais de 50% de inibição, enquanto que *T. tomentosum* 36/02, *T. asperellum* 400/01 e *T. tomentosum* 476-02 menos de 10%. Barakat et al. (2006), utilizando 69 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de diferentes regiões da Palestina, obtiveram 47 isolados com significativa redução no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, variando de 20,8 a 66,8%, sendo os mais promissores pertencentes às espécies *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* e *T. lactea*.

Para a confrontação direta, os melhores resultados foram evidenciados pelos isolados CP21 e os armazenados, exceto TC1.15, uma vez que apresentaram nota igual ou inferior a 4, na escala de Bell (1982), enquanto os menos promissores foram os isolados do grupo SP, considerados pouco eficientes. Apesar dos isolados CP terem exibido a maior taxa de crescimento micelial apenas CP21 mostrou destaque na confrontação direta, sugerindo o envolvimento de mais de um mecanismo de ação, como liberação de metabólitos ou parasitismo. Vale ressaltar que o isolado TC1.15 teve lenta taxa de crescimento micelial, igualando-se ao patógeno, e baixa concentração de esporos.mL⁻¹, sugerindo que o armazenamento prolongado foi mais prejudicial do que para os demais.

O melhor desempenho na confrontação direta foi apresentado por UFSMT15.1, UFSMT17, ETSR20 e CP21, já que, segundo Ethur (2006), aqueles que apresentarem notas variando de 2 a 2,5 podem ser classificados como eficientes. Louzada et al. (2009) consideram que um isolado é antagônico ou eficiente, quando sua nota é menor ou igual a 3,0. Esse autor, trabalhando com amostras de solo com diferentes cultivos, obteve 230 isolados de *Trichoderma* spp., dos quais 111 apresentaram notas menores do que 3 contra *S. sclerotiorum*, 50 contra *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burkholder) Snyder & Hansen e apenas 24 isolados contra os dois patógenos, ou seja, 10% do total. A variação entre as notas desse ensaio (em que aproximadamente 42% dos isolados apresentaram eficiência antagônica) ocorreu porque o nível de controle varia dependendo da adaptação às condições bióticas e abióticas específicas, as quais os isolados são submetidos dentro e

entre as espécies do gênero *Trichoderma* (DENNIS; WEBSTER, 1971).

Dados de ensaios *in vitro* mostram que isolados de *T. harzianum* obtidos da rizosfera de plantas sintomáticas têm capacidade não apenas para inibir o desenvolvimento de patógenos através de metabólitos não voláteis, como também de parasitar, penetrar e colonizar as hifas de *S. sclerotiorum* (ABDULLAH et al., 2008). Outrossim, Louzada et al. (2009) ressaltam que não há relatos na literatura sobre a perda da diversidade de *Trichoderma* spp. causada pelo uso agrícola contínuo.

Ensaio *in vivo*

Fora constatado que a presença de *S. sclerotiorum* no substrato diminui estatisticamente a porcentagem de germinação de sementes de alface, porém a utilização de *Trichoderma* spp. associado ao patógeno reduz esse efeito, excetuando-se os isolados UFSMT15.1, CP12, CP21 e SP13 (Tabela 2). A aplicação direta de *Trichoderma* spp. permite o aumento significativo na porcentagem e precocidade de germinação em sementes de tomate, porém quando armazenados por pelo menos dois meses alguns isolados podem promover decréscimo no *stand* final das plantas (TSAHOURIDOU; THANASSOULOPOULOS, 2002). Diante disso, na presença apenas do biocontrolador, alguns isolados, os armazenados UFSMT15.1, TC1.15, ETSR20 e os nativos CP21 e SP13, manifestaram-se negativamente, diminuindo a porcentagem de germinação de sementes. Um dos problemas ao tratar sementes com agentes de biocontrole é que estes eventualmente afetam negativamente a germinação (LUCON, 2009), já que podem utilizar a semente com substrato, colonizando-a.

Diferente dos resultados de germinação, a porcentagem de sobrevivência não diferiu entre a testemunha absoluta e a infestada apenas com *S. sclerotiorum*. Os isolados UFSMT17, CP11, CP22, SP23 e SP24 superaram a testemunha absoluta, promovendo ganhos de sobrevivência. TC1.15, no entanto, atuou negativamente na ausência do patógeno, já que foi estatisticamente maior na presença do mesmo. Dos isolados aplicados 75% apresentaram capacidade de aumentar a sobrevivência das plântulas na presença do patógeno.

Além disso, cerca de 51% das plântulas testemunha contendo apenas o patógeno sobreviveram 21 dias após a semeadura, comparado com 82% quando se utilizou o tratamento com *T. harzianum*, obtendo plântulas mais saudáveis e vigorosas (INBAR et al., 1996). Esses resultados confirmam os de Abdullah et al. (2008), que aplicando *T. harzianum* nativo em plântulas de tomate obtiveram mais de 80% no controle de *S. sclerotiorum*.

Tabela 2. Emergência (%), plântulas sobreviventes (%) e Índice de Velocidade de Emergência - IVE para plântulas de alface cv. Regina oriundas de sementes tratadas com *Trichoderma* spp. de diferentes origens, na ausência e presença de *S. sclerotiorum*. Santa Maria (RS), 2012.

<i>Trichoderma</i> spp.	Germinação (%)		Sobreviventes (%)		IVE	
	Controle	Infestado ²	Controle	Infestado	Controle	Infestado
Testemunha	73 aA ¹	53 bB	50 bA	52 bA	1,44 aA	0,80 bB
UFSMT15.1	51 bA	53 bA	39 bA	47 bA	0,81 bA	0,99 bA
UFSMT17	74 aA	77 aA	69 aA	71 aA	1,50 aA	1,82 aA
TC1.15	42 bB	66 aA	36 bB	56 aA	0,80 bA	1,16 bA
ETSR20	60 bA	74 aA	47 bA	64 aA	1,56 aA	1,91 aA
CP11 ²	80 aA	73 aA	76 aA	66 aA	1,62 aA	1,46 aA
CP12	76 aA	41 bB	54 bA	40 bA	1,74 aA	1,44 aA
CP21	62 bA	47 bA	56 bA	40 bA	1,43 aA	0,82 bA
CP22	70 aA	70 aA	62 aA	63 aA	2,02 aA	1,03 bB
SP13 ³	62 bA	58 bA	51 bA	56 aA	1,75 aA	1,01 bB
SP23	78 aA	65 aA	67 aA	60 aA	2,26 aA	1,51 aB
SP14	65 aA	76 aA	51 bA	59 aA	1,60 aA	1,87 aA
SP24	67 aA	65 aA	60 aA	64 aA	1,65 aA	1,26 bA
CV (%)	19,73		24,66		31,25	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05); ²Infestado: substrato infestado com *S. sclerotiorum* ³CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ⁴SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

Os resultados do IVE (Tabela 2) confirmam que a presença do patógeno é prejudicial ao desenvolvimento inicial de mudas de alface, visto que as testemunhas com e sem inoculação do patógeno diferiram estatisticamente entre si, bem como CP22, SP13 e SP23, que também foram significativamente menores quando comparados aos mesmos tratamentos na ausência do patógeno.

Com exceção dos isolados UFSMT15.1 e TC1.15, os quais foram significativamente menores do que a testemunha absoluta para a variável IVE, os demais apresentaram capacidade de promover ganhos na velocidade de germinação. Sementes de tomate cv. Jubilee tratadas com T22 (*T. harzianum*) também tiveram aumento na velocidade de

germinação (MASTOURI et al., 2010).

O tratamento com *Trichoderma* spp. promoveu ganhos de comprimento da parte aérea nas plântulas de alface de até 1,16 cm ou 34% em relação à testemunha absoluta, sugerindo que o mesmo atua como promotor de crescimento (Tabela 3). Na presença de *S. sclerotiorum* os isolados UFSMT15.1, TC1.15, CP21, CP22, SP13, SP23 e SP24 não apresentaram bons resultados. Tsahouridou e Thanassouloupoulos (2002) reforçam que o tamanho de plântulas inoculadas com *Sclerotium rolfisii* e tratadas com *Trichoderma* spp. foram maiores em todos os tratamentos utilizados e com maior matéria seca do que nos tratamentos controle.

Tabela 3. Crescimento da parte aérea (CPA), crescimento do sistema radicular (CSR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) para plântulas de alface cv. Regina oriunda de sementes tratadas com *Trichoderma* spp. obtidos de diferentes origens, na ausência e presença de *S. sclerotiorum*. Santa Maria (RS), 2012.

<i>Trichoderma</i> spp.	CPA (cm)		CSR (cm)		MSPA ⁴ (g)		MSSR ⁴ (g)		MST ⁴ (g)	
	Cont. ¹	Infestado ²	Cont.	Infestado	Cont.	Infestado	Cont.	Infestado	Cont.	Infestado
Testemunha	3,44bA ³	3,70aA	2,70bB	4,68aA	0,025 cA	0,072aA	0,007aA	0,017cA	0,032 cA	0,089bA
UFSMT15.1	3,04bA	3,01bA	2,35bA	1,84bA	0,025 cA	0,012bA	0,007aA	0,002cA	0,032 cA	0,014cA
UFSMT17	3,82aA	3,70aA	2,36bB	4,39aA	0,045 cB	0,102aA	0,010aB	0,067aA	0,055 cB	0,169aA
TC1.15	3,28bA	2,96bA	2,40bA	2,01bA	0,040 cA	0,020bA	0,007aA	0,002 cA	0,047 cA	0,022 cA
ETSR20	3,68bA	3,95aA	2,68bB	4,85aA	0,077bA	0,085aA	0,007aA	0,020cA	0,084cA	0,097bA
CP11 ⁵	4,60aA	3,70aB	2,53A	2,51bA	0,057 cA	0,092aA	0,002aA	0,010cA	0,059cA	0,104bA
CP12	4,29aA	3,68aA	4,28aA	2,97bA	0,157aA	0,037bB	0,030aA	0,002 cA	0,187aA	0,038 cB
CP21	3,48bA	3,08bA	2,44bA	2,54bA	0,062 cA	0,027bA	0,012aA	0,005 cA	0,074cA	0,032 cA
CP22	3,90aA	3,15bB	3,32aA	2,40bA	0,082bA	0,027bA	0,005aA	0,007cA	0,089bA	0,034cA
SP13 ⁶	3,86aA	3,20bA	3,73aA	4,13aA	0,087bA	0,140aA	0,022aA	0,032bA	0,109bA	0,172aA
SP23	4,06aA	3,03bB	2,90bA	3,69aA	0,085bA	0,090aA	0,025aA	0,045bA	0,110bA	0,135bA
SP14	3,06bA	3,76aA	2,09bB	3,72aA	0,035 cA	0,062aA	0,003aA	0,017cA	0,038 cA	0,079bA
SP24	3,45bA	3,31bA	2,37bB	3,91aA	0,057cA	0,077aA	0,007aA	0,010cA	0,064cA	0,087bA
CV (%)	14,36		29,38		2,93		1,55		3,64	

¹Cont.: tratamentos controle, sem *S. sclerotiorum*; ²Infestado: substrato infestado com *S. sclerotiorum*; ³Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05); ⁴Análise estatística reali-

zada com dados transformados em $\sqrt[3]{x + 0,5}$; ⁵CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ⁶SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

Para a variável crescimento do sistema radicular fora observado que as plântulas cultivadas em substrato infestado com *S. sclerotiorum* foram superiores à testemunha absoluta, o que pode ter permitido às plântulas desencadear uma resposta contra o patógeno, forçando o crescimento das raízes em busca de nutrientes para fugir do ataque fúngico. Nas plântulas tratadas apenas com *Trichoderma* spp. os isolados CP12, CP22 e SP13 se destacaram, sugerindo que estes atuam como promotores de crescimento do sistema radicular, já que permitiram ganhos de até 1,58 cm quando comparados às médias da testemunha absoluta.

Nas plântulas tratadas com o biocontrolador na ausência do patógeno verificou-se que UFSMT17, ETSR20, SP14 e SP24 tiveram valores para o sistema radicular estatisticamente iguais à testemunha absoluta, porém menores do que os seus correspondentes cultivados em substrato infestado com *S. sclerotiorum*, dando indícios que os referidos isolados agiram mais ativamente na presença do que na ausência do patógeno no substrato. Conforme sugerido por Pinto et al. (2011), pode ser uma característica específica da alface cv. Regina, já que também relataram maiores resultados para plantas cultivadas na presença de fitopatógenos, sugerindo que essa cultivar, em especial, pode ter moderada resistência a infecções fúngicas.

Todos os isolados do grupo CP, UFSMT15.1 e TC1.15 foram estatisticamente inferiores à testemunha na presença de *S. sclerotiorum*. Em especial, os dois últimos repetiram-se como ineficientes controladores do patógeno, assim como no crescimento da parte aérea. Segundo Mastouri et al. (2010), *Trichoderma* spp. são favorecidos pela presença de raízes, as quais colonizam facilmente, e aqueles que colonizam melhor a rizosfera podem ser adicionadas ao solo ou em sementes por qualquer método.

A promoção de crescimento desempenhada por *Trichoderma* spp. é confirmada pelos resultados obtidos para o peso de matéria seca da parte aérea em plantas cultivadas na ausência do patógeno, com destaque para CP12, com ganhos significativos em relação à testemunha absoluta, seguido de ETSR20, CP22, SP13 e SP23. Assim como Pinto et al. (2011) relatam que plantas de alface não inoculadas com *S. sclerotiorum* apresentaram menores médias de matéria seca da parte aérea do que as inoculadas verificou-se também que a testemunha inoculada apenas com *S. sclerotiorum* obteve melhor média.

Para os dados de matéria seca do sistema radicular, na ausência do patógeno, os isolados de *Trichoderma* spp. não mostraram diferenças significativas em relação à testemunha absoluta, porém UFSMT17 foi estatisticamente menor do que o seu correspondente na presença de *S. sclerotiorum*. Na presença do patógeno, o mesmo isolado UFSMT17 foi o melhor, seguido por SP13 e SP23, com os demais igualando-se estatisticamente à testemunha. Em solo infestado por *Pythium* spp. ocorreu redução da maté-

ria seca do sistema radicular em mudas de tomate, enquanto em sementes tratadas com *T. harzianum* as plântulas tiveram aumento de 46% quando comparadas à testemunha absoluta (MASTOURI et al., 2010).

Confirmando o potencial de biocontrole exercido pelos isolados de *Trichoderma* spp., CP12 obteve maior média para a matéria seca total em plântulas de alface cultivadas apenas com o biocontrolador, enquanto em substrato infestado com *S. sclerotiorum* os isolados UFSMT17 e SP13 foram os melhores. Os isolados UFSMT15.1, TC1.15, CP21 e CP22 apresentaram resultados insatisfatórios, sendo estatisticamente menores do que a testemunha infestada com o patógeno, sugerindo que os mesmos não são bons controladores de *damping-off* causado por *S. sclerotiorum* em plântulas de alface.

CONCLUSÕES

Dos oito isolados nativos de *Trichoderma* identificados dois pertencem a espécies *T. koningio-opsis* e seis a *T. asperellum*. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados foram eficazes na redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em meio de cultura, independente de sua origem.

Os isolados utilizados foram eficientes no controle de *S. sclerotiorum*, proporcionando maiores porcentagens de sobrevivência de plântulas de alface microbiolizadas, além de promoverem ganhos de matéria seca da parte aérea. No entanto, os isolados armazenados apresentaram redução na viabilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, devendo-se optar, sempre que possível, por isolados nativos oriundos de áreas onde foi constatada a presença da doença em questão.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M.T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1354-1359, 2008.

ÁVILA, Z. R. et al. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2005, 30p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 117).

BARAKAT, R. M.; AL-MAHAREED, F.; AL-MASRI, M. I. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. **Hebron University Research Journal**, Hebron, v. 2, n. 2, p. 27-47, 2006.

- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009.
- BRITO, J. P. C. et al. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. **Springer Plus**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 600-610, 2014.
- BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M.; STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2010.
- CLARKSON, J. P. et al. A model for *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce, based on the effects of temperature, relative humidity and ascospore density. **Plos One**, Cambridge, v. 4, n. 9, p. 1-12, 2014.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal Interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 57, n. 3, p. 363-369, 1971.
- DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Review Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.
- 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: Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GARCÍA-NÚÑEZ, H. G. Isolation of native strains of *Trichoderma* spp. from horticultural soils of the Valley of Toluca, for potential biocontrol of *Sclerotinia*. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Valencia, v. 15, n. 2, p.357-365, 2012.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Método de isca para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagonísticos a *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1989. 13p. (Boletim de Pesquisa, 3).
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Functional Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 6, p. 615-631, 2009.
- INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 28, n. 6, p. 757-763, 1996.
- KIN, H. et al. Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 21, p. 7721-7729, 2011.
- LILLY, G.V.; BARNETT, H. L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill Book, 1951. 464 p.
- LOPES, F. A. C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 116, n. 7, p. 815-824, 2012.
- LOUZADA, G. A. S. et al. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotrópica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.
- MASTOURI, F.; BJÖRMAN, T.; HARMAN, G. E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 11, p. 1213-1221, 2010.
- PINTO, Z. V. et al. Podridão de raízes causadas por *Pythium aphanidermatum* em cultivares de alface produzidas em sistema hidropônico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 4, p. 180-186, 2011.
- QUALHATO, T. F. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 9, p. 1461-1468, 2013.
- RODRIGUES, J. ***Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*-feijoeiro**. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alficultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.
- TSAHOURIDOU, P. C.; THANASSOULOPOULOS, C. C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in

the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 34, n. 6, p. 767-776, 2002.