

# EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO E CAPACIDADE PARASÍTICA DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. SELECIONADOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum*

MARIANA FERNANDES<sup>1</sup>; MARCELO A.B. MORANDI<sup>2</sup>; ELEN R. SANTOS<sup>3</sup>; LÚCIO B. COSTA<sup>4</sup>

Nº 0702013

## Resumo

O mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) é a doença mais destrutiva do feijoeiro nos plantios de inverno, quando os dias são mais curtos e as temperaturas mais amenas (15 a 25°C). Além das práticas culturais que contribuem para a redução do inóculo do patógeno no solo, o uso de agentes de controle biológico têm se intensificado. Espécies de *Trichoderma* são recomendados com relativo sucesso para o controle da doença em diversos países. A maioria das espécies de *Trichoderma* desenvolve-se melhor em temperaturas superiores a 25°C. No Brasil, produtos à base de *Trichoderma* são utilizados em algumas regiões produtoras que apresentam temperatura elevada no inverno, entretanto, são pouco eficientes em regiões ou épocas de temperatura mais frias. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura (15, 20, 25, 30 e 35°C) sobre o crescimento e capacidade de parasitismo de três isolados de *Trichoderma* spp. (T66, T111 e T409) previamente selecionados para o controle do mofo branco. Foram avaliados o crescimento radial das colônias e a germinação de esporos em meio de cultura, além da capacidade de parasitismo sobre escleródios do patógeno no solo. A germinação de esporos e o crescimento das colônias de todos os isolados foram maiores entre 20 e 30°C. Já a capacidade de inibição da germinação e parasitismo de escleródios foi variável entre os isolados e as temperaturas. De forma geral, nenhum dos isolados foi eficiente em parasitar os escleródios do patógeno nas temperaturas mais baixas (15 a 20°C). Portanto, são necessárias novas avaliações na busca de isolados mais eficientes para o cultivo de outono-inverno.

## Abstract

Bean white mold is a destructive disease on autumn-winter crops, when daylight length is short and the temperatures vary from 15 to 25°C. In addition to the cultural practices that contribute to inoculum reduction on soil, the use of biological control agents is an emergent

<sup>1</sup> Graduação em Ciências Biológicas, PUC, Campinas, SP.

<sup>2</sup> Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, e-mail: mmorandi@cnpma.embrapa.br

<sup>3</sup> Colaboradora: Assistente, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

practice in Brazil. *Trichoderma* species are natural antagonists to *S. sclerotiorum* sclerotia in soil and its use is recommended in several countries. In general the development of the isolates applied as biocontrol agents is favored by temperatures above 25°C. In Brazil, commercial products based on *Trichoderma* are been used in some areas where the winter temperatures are higher. However, these products are not efficient on colder areas. The objective of this work was to evaluate the effects of the temperature (15, 20, 25, 30 e 35°C) on the growth of three *Trichoderma* spp. isolates (T66, T111 e T409) previously selected to control the white-mold pathogen. The conidia germination and micelial growth on agar media and the ability to parasitize the pathogen sclerotia on soil were investigated. The conidia germination and micelial growth of all isolates were higher between 20 e 30°C. The parasitism over the sclerotia on soil was variable among the isolates and among the temperatures. None of the evaluated isolates was able to parasitize efficiently the sclerotia of the pathogen on lower temperatures (15 to 20 °C). In conclusion, new isolates should be evaluated for use in autumn-winter crops.

## **Introdução**

O cultivo de inverno responde por 14% da produção nacional de feijão. O mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma das doenças mais destrutiva do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), especialmente nos plantios irrigados de outono-inverno, quando os dias são mais curtos e as temperaturas amenas (15-25°C). A doença é mais prejudicial quando há crescimento vegetativo abundante, pouco arejamento e penetração da luz, drenagem do solo insuficiente e rotações de cultura inadequadas (Paula Jr. e Zambolim, 2006).

O controle químico é caro, os riscos de contaminação do ambiente são altos e, como medida isolada, pode ter eficiência baixa. Além das práticas culturais, o uso de agentes de biocontrole (ACB) pode contribuir para a redução do inóculo do patógeno no solo. A presença de microrganismos antagônicos no solo afeta a sobrevivência dos escleródios de *S. sclerotiorum* e reduz paulatinamente o potencial de inóculo. Mais de 30 espécies de fungos e bactérias são relatadas como antagonistas ou parasitas do patógeno (Whipps e Budge, 1990). Entre estes destacam-se várias espécies de *Trichoderma*. O antagonista se associa aos escleródios, causa sua degradação ou impede-os de germinar. A sobrevivência do patógeno nas áreas irrigadas do cerrado foi reduzida pela presença de isolados de *Trichoderma* sp. associados aos escleródios (Arancibia et al., 2001). Espécies de

---

<sup>4</sup> Graduação em Ciências Biológicas, Unipinhal, Espírito Santo do Pinhal, SP.

*Trichoderma* prevalecem em ambientes úmidos e podem ser isoladas de todas as zonas climáticas (Klein e Everleigh, 1998). O desenvolvimento das espécies de *Trichoderma* mais utilizadas como ACB é favorecido por temperaturas acima de 25°C. O uso desses agentes em áreas e/ou épocas de temperaturas amenas pode ser pouco eficiente (Bernardes, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura sobre o crescimento e capacidade de parasitismo de três isolados de *Trichoderma* spp. (T66, T111 e T409) previamente selecionados para o controle do mofo branco e, assim, verificar a viabilidade de uso destes isolados em temperaturas amenas, semelhantes às condições climáticas do cultivo de outono-inverno.

### **Material e Métodos**

Para avaliação do crescimento micelial, os isolados *Trichoderma* (T66, T111 e T409), foram crescidos em BDA por 10 dias a 25 °C, quando discos de micélio das bordas das colônias foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA e mantidas em diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e 38°C) em câmaras de crescimento com fotoperíodo regulado para 12 h. Foram feitas três repetições para cada isolado, e para cada temperatura, sendo que cada repetição foi composta por uma placa de Petri. Os diâmetros da colônia no sentido transversal e longitudinal de crescimento foram medidos após 2 e 6 dias.

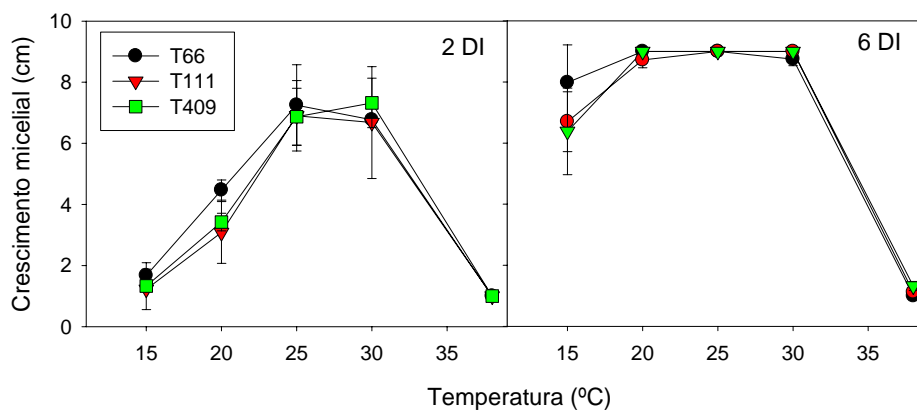
Para avaliação da germinação de esporos dos fungos, alíquotas de 100 µL de suspensão de esporos dos isolados de *Trichoderma* ( $1 \times 10^7$  conídios por ml) foram depositadas no centro de placas de Petri com meio BDA acidificado e espalhados com alça por todo o meio. Após 24 h de incubação, em câmaras de crescimento nas diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e 35°C), foi feita a contagem de esporos germinados em microscópio ótico. Os esporos foram considerados germinados quando o tamanho do tudo germinativo era superior ao diâmetro do esporo. Foram realizadas três repetições por tratamento.

Para avaliação da atividade hiperparasítica dos isolados de *Trichoderma* sobre escleródios de *S. sclerotiorum*, solo livre de escleródios do patógeno foi coletado em área de cultivo de feijão, desinfestado em coletor solar (Ghini, 2004) e distribuído em vasos de 200 mL de capacidade. Em cada vaso foram depositados cinco escleródios de *S. sclerotiorum*, produzidos assepticamente em meio de cenoura e fubá, e cobertos com 0,5 cm do mesmo solo. Os seguintes tratamentos foram aplicados com quatro repetições por tratamento: testemunha (onde foi pulverizada água destilada esterilizada); fungicida (fluazinam, na dose recomendada); e os isolados de *Trichoderma* (concentração de  $10^7$  conídios/mL e volume

de calda equivalente a 300 L/ha). Os vasos foram cobertos por filme plástico transparente (rolopac), mantidos nas diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e 35°C) e fotoperíodo de 12 h em câmara de crescimento por cinco dias. Após esse período, os escleródios foram recuperados, limpos com pincel e água destilada e depositados sobre discos de cenoura previamente desinfestados em placas de petri contendo ágar-água. Cada placa de Petri conteve cinco discos de cenoura e cinco escleródios (= uma repetição). As placas foram mantidas nas mesmas temperaturas. A avaliação foi feita através da observação do crescimento fúngico sobre os escleródios, com o auxílio de microscópio estereoscópico, após cinco dias da deposição dos escleródios sobre os discos de cenoura. Foram anotados o número de escleródios germinados (crescimento de *S. sclerotiorum*) e o número de escleródios parasitados (com crescimento do antagonista em sua superfície). Os escleródios não germinados após as cinco avaliações foram transferidos para meio BDA e incubados nas mesmas condições por cinco dias, para confirmar o parasitismo pelos antagonistas.

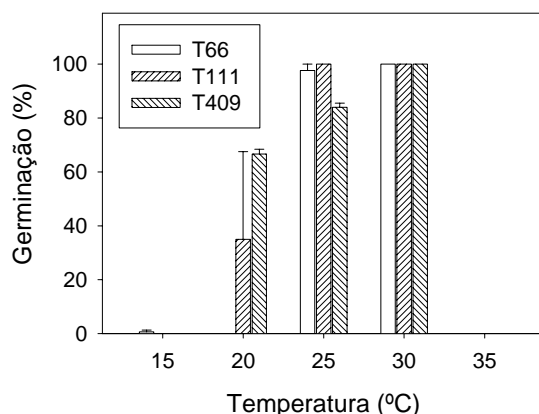
## Resultados e Discussão

O crescimento micelial dos três isolados de *Trichoderma* sp. avaliados foi máximo nas temperaturas entre 20 e 30°C, sendo que a 38°C o crescimento foi quase totalmente inibido (Figura1).



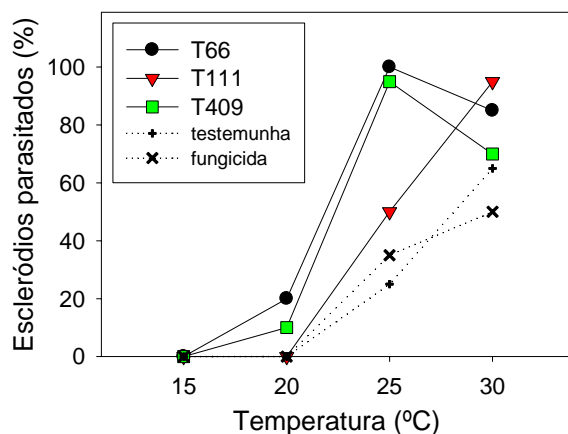
**FIGURA 1.** Crescimento micelial de isolados de *Trichoderma* spp. (T66, T111 e T409) em diferentes temperaturas aos 2 e 6 dias de incubação (DI).

A 15 e 35°C a germinação de esporos de todos os isolados foi completamente inibida. A 20°C a germinação dos esporos do isolado T66 foi praticamente nula, enquanto que dos outros isolados variou de 40 a 70%. A 25 e 30°C todos os isolado germinaram acima de 90% (Figura 2).



**FIGURA 2.** Germinação de esporos de isolados de *Trichoderma* spp. (T66, T111 e T409) em diferentes temperaturas.

Observou-se baixa germinação dos escleródios e pouca ou nenhuma atividade parasítica de *Trichoderma* sp. a 15°C (Figura 3). A 20°C houve pequena atividade parasítica de escleródios de dois isolados (T66 e T409) (Figura 3). A 25°C os isolados T66 e T409 parasitaram 100% e 95% dos escleródios do patógeno, respectivamente, enquanto que o isolado T111 parasitou cerca de 50% dos escleródios (Figura 3). A 30°C, entretanto, o isolado T111 parasitou 95% dos escleródios, enquanto que os outros isolados parasitaram 85% e 70%, respectivamente para T66 e T409 (Figura 3). Nas temperaturas de 25 e 30°C observou-se crescimento de *Trichoderma* também na testemunha e no tratamento com fungicida, entretanto, não foi possível determinar se a contaminação foi por um dos isolados aplicados ou por isolados nativos no solo. A 35°C não ocorreu germinação de escleródios e nem atividade parasítica de *Trichoderma*.



**FIGURA 3.** Parasitismo de isolados de *Trichoderma* spp. (T66, T111 e T409) sobre escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas.

Os resultados obtidos indicam que há diferenças de comportamento entre os isolados em relação à capacidade de parasitar escleródios do patógeno em diferentes temperaturas. De forma geral, todos os isolados foram mais eficientes nas temperaturas de 20 a 30°C. Entretanto, nenhum dos isolados foi eficiente nas temperaturas extremas (15 e 35 °C). Considerando que o mofo branco é mais severo em temperaturas mais amenas (15 a 25°C), os isolados avaliados neste estudo apresentaram apenas capacidade de controle marginal do patógeno sob temperaturas mais baixas. Portanto, são necessárias novas avaliações na busca de novos isolados mais eficientes para o cultivo de outono-inverno.

### **Referências Bibliográficas**

ARANCIBIA, R. C.; NASSER, L. C. B.; GOMES, A. C.; NAPOLEÃO, R. Density, viability and frequency of fungi associated to sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in irrigated areas of the cerrado (savanna) region of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 338-339, 2001.

BERNARDES, A. **Intensidade do mofo-branco do feijoeiro em função da densidade de plantio e da aplicação de *Trichoderma* spp.** 2006. 40 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, MG.

GHINI, R. **Coletor solar para desinfestação de substratos para produção de mudas sadias.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 5 p. (Embrapa Meio Ambiente. Circular Técnica, 4). Disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/download/circular\\_4.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/download/circular_4.pdf)>. Acesso em: 5 dez. 2005.

KLEIN, D.; EVERLEIGH, D. E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). ***Trichoderma & Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications.** London: Taylor & Francis, 1998. v. 1, p. 57-74.

PAULA JÚNIOR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão.** Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 359-414.

WHIPPS, J. M.; BUDGE, S. P. Screening for sclerotia mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, p. 607-612, 1990.

### **Agradecimentos**

Este trabalho é parte do projeto apoiado pela Fapesp (processo nº 06/01284-9).