

# Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro *in vitro*<sup>1</sup>

Priscila Pauly Ribas<sup>2</sup>, Aida Terezinha dos Santos Matsumura<sup>3</sup>, Sueli Teresinha Van Der Sand<sup>4</sup>

**Resumo** - A ocorrência de doenças é o principal fator de redução na produção do feijoeiro comum no Brasil. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum* são agentes causais de importantes doenças dessa cultura. Para que haja sucesso do controle biológico dessas e outras doenças, o conhecimento dos metabólitos produzidos pelos agentes de controle biológico, como *Trichoderma* spp. é essencial. Sob esse ponto de vista, este trabalho visou caracterizar diferentes isolados de *Trichoderma* spp. de acordo com os metabólitos produzidos pelos mesmos e verificar a capacidade antagonista desses isolados contra os patógenos citados. Foram testados 25 isolados, de três diferentes espécies de *Trichoderma*, quanto à produção de enzimas hidrolíticas, AIA e sideróforos bem como a capacidade de inibição do desenvolvimento dos patógenos por produção de metabólitos voláteis e antagonismo em teste de cultura pareada. Todos os isolados produziram quitinases, glucanases, proteases, AIA e sideróforos. A produção de metabólitos voláteis *in vitro* contra *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi eficiente em 24% dos isolados testados e 20% deles inibiram o crescimento de *S. sclerotiorum*. Em cultura pareada, a redução no crescimento de *S. sclerotium* variou entre 67,5-100%, enquanto para *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* a redução foi de 29-50%.

**Palavras-chave:** Murcha de *Fusarium*. Mofo branco. *Trichoderma* spp.

## *Trichoderma* characterization and potential of biological control against bean phytopathogens *in vitro*

**Abstract** - The occurrence of diseases is the main reason for reduction in common bean production in Brazil. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* and *Sclerotinia sclerotiorum* are the causative agents of important diseases of this crop. For the biological control to be successful for these and other diseases, the knowledge of the metabolites produced by the biocontrol agents such as *Trichoderma* spp. is essential. From this point of view, this study aimed to characterize different isolates of *Trichoderma* spp. according to their metabolites production and verify the ability of these antagonistic isolates against the pathogens above mentioned. Twenty five isolates were tested, from three different species of *Trichoderma*. Their ability to produce hydrolytic enzymes, IAA and siderophores as well as their ability to inhibit the development of pathogens by the production of volatile metabolites and antagonism in paired culture were analyzed. All isolates produced chitinase, glucanases, proteases, IAA and siderophores. The production of volatile metabolites *in vitro* against *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* was effective with 24% of the isolates tested and 20% were able to inhibit the growth of *S. sclerotiorum*. In paired cultures, the reduction in growth for *S. sclerotium* ranged from 67.5 to 100%, while for *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* reduction was from 29-50 %.

**Key words:** *Fusarium* wilt. White mold. *Trichoderma* spp.

<sup>1</sup> Manuscrito recebido em 21/03/2014 e aceito para publicação em 20/10/2014.

<sup>2</sup> Doutoranda do PPGMAA, bolsista Capes. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, sala 150, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: [pripauly@gmail.com](mailto:pripauly@gmail.com) – Telefone: (51) 3308.3539.

<sup>3</sup> Doutora em Genética e Biologia Molecular, responsável técnica da empresa ICB BIOAGRITEC LTDA, Rua Arabutan, 386, CEP: 90240-470, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: [aida@ufrgs.br](mailto:aida@ufrgs.br) – Telefone: (51) 3022.2985.

<sup>4</sup> PhD em Bioquímica e Microbiologia Molecular, professor associado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, sala 150, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: [svans@ufrgs.br](mailto:svans@ufrgs.br) – Telefone: (51) 3308.4505.

## Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de feijão (*Phaseolus viulgaris* L.), tendo ocupado o primeiro lugar em sete dos últimos dez anos. O feijoeiro comum é cultivado no Brasil durante todo o ano por pequenos, médios e grandes produtores, em ecossistemas subtropical e tropical. Na safra 2012/2013, o país produziu 2,83 milhões de toneladas, com um rendimento médio de 924 kg ha<sup>-1</sup>. Segundo Pereira et al. (2011), ocorrência de doenças é uma das principais causas de redução na produtividade do feijoeiro, e podem ser transmitidas por bactérias, fungos vírus e nematoides, entre as quais se destacam o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e a murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*). O controle químico tem sido usado para o controle dessas doenças, mas o uso intensivo de agrotóxicos tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação dos agricultores; a resistência de patógenos a certos princípios ativos dos produtos aplicados; o surgimento de doenças iatrogênicas; o desequilíbrio ecológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade, entre outros (MORANDI e BETTIOL, 2009).

Antagonistas de fungos fitopatogênicos têm sido usados em controle biológico de doenças de plantas, reduzindo os efeitos dos impactos provocados pelo controle químico. Quando usados em combinação com agrotóxicos em estratégias de manejo integrado, reduzem ainda os resíduos pós-colheita e a quantidade final de fungicidas aplicados, mantendo os níveis de supressão dos patógenos semelhante ao esperado com o tratamento químico (LIMA et al., 2011). Grande parte das aplicações de agentes de controle biológico tem sido realizada com diferentes isolados do fungo *Trichoderma* (BENÍTEZ, et al., 2004). As espécies de *Trichoderma* geralmente são encontradas como componentes da microbiota da grande maioria dos tipos de solos, especialmente os orgânicos, incluindo a camada de húmus das florestas, solos agrícolas no campo e em pomares, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (DRUZHININA et al., 2011).

O sucesso de *Trichoderma* no controle biológico está associado à sua alta capacidade

reprodutiva, habilidade de se desenvolver em condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificação da rizosfera, alta agressividade contra fungos fitopatogênicos e eficiência na promoção de crescimento e indução de mecanismos de defesa nas plantas (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004). Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar diferentes isolados de *Trichoderma* spp. de acordo com os metabólitos produzidos pelos mesmos e verificar a capacidade antagonica destes contra patógenos do feijoeiro.

## Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foram testados 25 isolados de *Trichoderma* spp. nos experimentos realizados. Os isolados pertencem a três diferentes espécies, identificados como ICB01, ICB02, ICB03, ICB04, ICB06, ICB07, ICB08, ICB09, ICB10, ICB11, ICB12, ICB13, ICB14, ICB15, ICB16, ICB17, ICB18, ICB19, ICB20, ICB21, ICB22, ICB23, ICB 24 (*Trichoderma asperellum*), ICB05 (*Trichoderma harzianum*) e ICB25 (*Trichoderma virens*) e pertencem à Micoteca da empresa ICB BIOAGRITEC LTDA., Porto Alegre, Brasil.

Para a avaliação da produção de enzimas hidrolíticas, os isolados de *Trichoderma* foram crescidos em meio de cultura Mandel e Reese (1960) modificado (peptona bacteriológica 0,1%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,14%; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,03%; uréia 0,03%; glicose 3%; CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0,03%; micélio seco de *Bipolaris sorokiniana* 0,5%; 100 µL de solução de elemento traço, pH 6,0) durante cinco dias, sob agitação orbital de 150 rpm em câmara de crescimento a 25±2°C. O micélio seco de um patógeno foi adicionado ao meio para estimular a produção de enzimas pelo antagonista. A análise da atividade quitinásica e glucanásica foi baseada no método de Miller (1959), medindo a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de quitina coloidal e da laminarina, respectivamente, pelo uso de ácido dinitrosalicílico (DNS). A absorbância foi medida em espectrofotômetro em λ= 545 nm. Para determinação da atividade enzimática foi preparada uma curva de calibração com glicose nas concentrações de 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; e 0,3 mg

mL<sup>-1</sup>. Uma atividade enzimática (U) corresponde a liberação de 1 μmol de glicose (mL min)<sup>-1</sup>. A determinação da atividade proteásica foi baseada no método de Sarath et al. (1989) utilizando azocaseína 2% como substrato. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em λ= 440 nm. Uma atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade em 30 minutos a 25°C, em um λ= 440 nm.

Para a avaliação da produção de ácido indol acético, os isolados de *Trichoderma* spp. foram inicialmente cultivados em meio de cultura BDA e mantidos durante três dias em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 12 h de luz. A partir destas colônias foram retirados discos de 8,0 mm contendo micélio e esporos do fungo e, em seguida, foram repicados em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de meio BD suplementado com 500 μg mL<sup>-1</sup> de triptofano. Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm agitador climatizado com temperatura de 25±2°C, por cinco dias. Após esse período, o meio foi filtrado com auxílio de algodão hidrófilo branco em um funil. Do filtrado da cultura foi retirado uma alíquota de 1,5 mL das amostras e adicionado 1,5 mL de reagente de Salkowsky (150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7,5 mL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 250 mL de água destilada). A reação foi realizada durante 20 min no escuro e posteriormente as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro em λ= 530 nm. Para a determinação da concentração de AIA na amostra, foi preparada uma curva de calibração preparada com ácido indol acético nas concentrações de 0, 1, 2, 4, 6, 10 e 16 μg mL<sup>-1</sup>.

A produção de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma* spp. foi detectada através da técnica universal para detecção de sideróforos proposta por Schwyn e Neilands (1987). Inicialmente, todos os materiais utilizados para o desenvolvimento dos ensaios foram lavados com HCl 6M e, após, imersos em água deionizada por um período de 8 h e novamente enxaguados em água deionizada. Os isolados foram cultivados em meio de cultura BD, e incubados sob agitação de 150 rpm e temperatura de 25±2°C durante cinco dias. A mudança de cor da mistura do sobrenadante de azul para amarelo-avermelhado em um período de 15 minutos indica a produção de sideróforos pelo antagonista.

A avaliação da produção de metabólitos voláteis foi realizada através da inoculação de um disco de 0,8 cm de diâmetro contendo micélio

dos isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA e no centro de outra placa, com o mesmo meio, foi inoculado um disco do mesmo tamanho contendo micélio de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* ou de *Sclerotinia sclerotiorum*. A placa contendo os fitopatógenos foi invertida sobre a placa contendo o antagonista e seladas com filme plástico. As placas foram mantidas em uma temperatura de 25±2°C em câmara de crescimento durante cinco dias. Após o período de incubação o diâmetro das colônias do patógeno foram medidas com o auxílio de um paquímetro. A testemunha consistiu da inoculação do fitopatógeno na ausência de *Trichoderma* spp.

Para verificar o potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. atuarem no controle biológico de fitopatógenos do feijoeiro, utilizou-se a metodologia de cultura pareada proposta por Dennis e Webster (1971). Os diferentes isolados do antagonista e os fitopatógenos foram cultivados em meio de cultura BDA, durante cinco dias em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C. Um disco de micélio, de 0,8 cm de diâmetro de cada isolado de *Trichoderma* spp. e um disco de cada fitopatógeno foram inoculados em lados opostos da placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram mantidas nas mesmas condições descritas acima até que ocorresse um ponto de contato entre as duas colônias. Nesse momento, a colônia do fitopatógeno foi medida com o auxílio de um paquímetro. A testemunha consistiu da inoculação do fitopatógeno na ausência do antagonista.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como a média entre elas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os softwares utilizados para todas as análises estatísticas foram o Statística 7.0 (Statsoft) e SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

## Resultados e Discussão

As espécies de *Trichoderma* possuem um alto nível de diversidade genética e podem ser empregadas para a produção de uma ampla gama de produtos de interesse comercial e ecológico (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010), além de serem prolíferas produtoras de proteínas extracelulares, enzimas degradadoras e

metabólitos com atividades antibióticas, e podem atuar como agentes de controle biológico de doenças e promover o crescimento e desenvolvimento das plantas (HARMAN et al., 2004). Essa diversidade torna importante o estudo de cada isolado de *Trichoderma* spp. para determinar a atividade de interesse à qual pode ser melhor aplicado.

A produção de enzimas hidrolíticas, como quitinases, glucanases e proteases, que são enzimas degradadoras da parede celular, está diretamente relacionada com a capacidade de um fungo atacar diretamente outro, em um processo chamado de micoparasitismo, que envolve uma sucessão de eventos, incluindo reconhecimento, ataque e subsequente penetração e morte do hospedeiro (HARMAN et al., 2004). Qualhato et al. (2013) estudaram o micoparasitismo em espécies de *Trichoderma* contra fungos fitopatogênicos e concluíram que *T. harzianum* e *T. asperellum* possuem alta eficiência no controle *S. sclerotiorum* e *F. solani*, demonstrando potencial para serem utilizados em controle biológico das doenças provocadas por tais patógenos.

Todos os isolados produziram enzimas hidrolíticas. A concentração de quitinase produzida variou entre 7,86 e 13,54 U (Tabela 1). As maiores produções da enzima foram obtidas pelos isolados ICB04 (13,54 U) e ICB21 (12,67 U), enquanto os isolados ICB16 (7,86 U), ICB23 (7,92 U), ICB 25 (8,16 U), ICB13 (8,34 U), ICB19 (8,57 U) e ICB12 (8,69 U) apresentaram as menores concentrações de quitinase no experimento ( $p < 0,05$ ). A concentração máxima obtida nesse experimento foi cerca de duas vezes maior do que a concentração encontrada anteriormente, que obteve 6,2 U mL<sup>-1</sup> em *Trichoderma harzianum* após 96 h de cultivo. A maior produção pode ser explicada pela presença de micélio de um fitopatógeno no meio, o que induziria maior produção de enzimas. Segundo Rana et al. (2012), a enzima quitinase é produzida em níveis constitutivos pelos microrganismos. Gajera et al. (2012) concluíram que a atividade de quitinase é elevada durante o antagonismo, pois quando avaliado o seu potencial de inibição em *Aspergillus niger*, observaram uma elevação na atividade enzimática, variação entre 0,11 e 1,31 U mL<sup>-1</sup>.

A concentração de glucanase variou entre 4,08 e 25,62 U (Tabela 1). A maior concentração foi obtida pelo isolado ICB19 (25,62 U), enquanto os isolados ICB14 (5,41 U), ICB06 (5,37 U), ICB18

(5,34 U), ICB12 (5,10 U), ICB13 (4,76 U), ICB16 (4,59 U), ICB20 (4,48 U), ICB24 (4,46 U) e ICB15 (4,08 U) apresentaram as menores concentrações de glucanase ( $p < 0,05$ ). A maior concentração de glucanases entre os isolados de *Trichoderma* spp. testados foi superior à detectada para quitinases. Segundo De La Cruz et al. (1995), a produtividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (BGN13.1) corresponde à maior atividade extracelular em *Trichoderma harzianum*. Monteiro (2008) encontrou valores elevados para a produção de glucanases em *Trichoderma*, com concentrações variando entre 27 e 45 U dependendo do fitopatógeno utilizado como indutor no meio.

A concentração de protease que foi produzida variou entre 0,77 e 3,41 U (Tabela 1). As maiores concentrações foram produzidas pelo isolado ICB06 (3,41 U), enquanto que as menores concentrações de protease ( $p < 0,05$ ) foram observadas para os isolados ICB15 (0,99 U), ICB17 (0,98 U), ICB23 (0,98 U), ICB12 (0,95 U), ICB11 (0,95 U), ICB02 (0,91 U), ICB20 (0,87 U), ICB04 (0,85 U), ICB19 (0,83 U) e ICB16 (0,77 U). No trabalho desenvolvido por De Marco et al (2003), os valores para a produção de proteases por isolados de *Trichoderma* spp. foram próximos aos obtidos neste trabalho, com melhores resultados em torno de 1,41 U mL<sup>-1</sup> após 72 h de inoculação.

O ácido indol acético é uma auxina natural encontrada em plantas, que atua como regulador de crescimento, causando efeito positivo no desenvolvimento e morfologia das raízes, além de aumentar o acesso aos nutrientes do solo (ZHAO, 2012). Os tecidos das raízes são especialmente sensíveis a flutuações nas concentrações de AIA e o desenvolvimento do sistema radicular pode ser afetado por fontes exógenas desse regulador, incluindo os provenientes de fontes microbianas (DUCA et al., 2014).

Neste ensaio, todos os isolados de *Trichoderma* spp. produziram AIA, variando entre 11,35 e 52,42  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Os isolados ICB05 (*T. harzianum*) e ICB06 (*T. asperellum*) produziram as maiores concentrações de AIA em relação aos demais isolados ( $p < 0,05$ ). Os demais isolados apresentaram concentrações semelhantes, não apresentando diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) (Figura 1). A capacidade de um microrganismo produzir AIA está associada com o seu potencial em estimular o crescimento vegetal (BENÍTEZ et al., 2004) e

diferentes estudos têm demonstrado a capacidade de *Trichoderma* produzir auxinas, como o AIA (GRAVEL et al., 2007; HERMOSA et al., 2012). Contreras-Cornejo et al. (2009) concluíram que a produção de auxinas por *Trichoderma virens* é capaz de estimular o crescimento e o desenvolvimento das raízes em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Comparando a atividade de um isolado de *Trichoderma harizianum* mutante com um isolado selvagem da mesma espécie, foi possível observar que o isolado mutante, que produzia maiores concentrações de AIA não foi apenas mais estável na promoção de crescimento em pepino, mas também mais eficiente do que o isolado selvagem (ZHANG et al., 2013).

Além de ter um efeito estimulante no crescimento das plantas, o AIA exógeno na rizosfera também pode ter efeito prejudicial sobre o alongamento das raízes em diferentes concentrações, fato que vem sendo associado ao aumento no nível de etileno na planta (HERMOSA et al. 2012). O AIA pode aumentar a atividade da enzima ACC sintase que catalisa a conversão de S-adenosil metionina ao composto 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), o precursor do etileno nas plantas (HERMOSA et al. 2012; ZÚÑIGA et al., 2013).

Outro mecanismo observado em *Trichoderma* spp. é a habilidade para competição por nutrientes limitados resultando na morte dos fitopatógenos por desnutrição. Em condições de baixa disponibilidade de Fe, muitos fungos são capazes de excretar um quelante de baixo peso molecular específico para o Fe (BENÍTEZ, et al., 2004). Os microrganismos da rizosfera também podem afetar fortemente a captação de Fe pelas plantas através da produção de sideróforos, que aumentam a mobilidade de Fe no solo, particularmente na rizosfera, e fornecem Fe solúvel para as plantas (BAR-NESS, et al., 1992). Segundo Delgado-Jarana et al. (2003), *Trichoderma* tem capacidade superior de mobilizar e captar nutrientes do solo comparado a outros microrganismos, o uso eficiente de nutrientes disponíveis é baseado na sua habilidade de obter ATP para seu metabolismo de diferentes açúcares, como aqueles derivados de polímeros amplamente disseminados no ambiente, como celulose, glucanos e quitinas entre outros, todos eles se transformando em glicose. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados neste experimento demonstraram capacidade de produzir sideróforos em baixas

concentrações de ferro (Tabela 2). Lehner et al. (2013) sugerem uma alta diversidade na produção de sideróforos por *Trichoderma* spp., tendo a ferricrocina um importante papel no armazenamento intracelular do ferro.

*Trichoderma* spp. pode produzir mais de 40 diferentes metabólitos secundários que podem contribuir na sua ação antagonística. Um grande número de metabólitos voláteis secundários são produzidos por *Trichoderma* spp., como etileno, cianeto de hidrogênio, aldeídos e cetonas, e desempenham um importante papel no controle de fitopatógenos e metabólitos, como ácido harzianico, alameticina e tricolina, que dificultam o crescimento de microrganismos (PADMAJA et al., 2013). Os 25 isolados testados produziram metabólitos voláteis capazes de inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Tabela 2). Os isolados ICB07, ICB11, ICB12, ICB16, ICB20 e ICB21 reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, em relação à testemunha. O isolado ICB20 apresentou maior eficiência na inibição do crescimento, reduzindo aproximadamente 33 % o diâmetro da colônia do patógeno. Os demais isolados não apresentaram diferença estatística significativa em relação à testemunha ( $p < 0,05$ ). Carvalho et al. (2011) avaliaram o efeito de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma harzianum* na inibição de crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e observaram que todos os isolados testados inibiram o crescimento do patógeno, reduzindo o diâmetro da colônia em aproximadamente 50% enquanto a redução da incidência do patógeno em sementes de feijão ficou entre 35 e 51% e proporcionando entre 73 e 81% de plântulas normais.

Quando avaliamos a ação dos metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* na inibição de crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, os isolados ICB05, ICB06, ICB11, ICB12 e ICB25 reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento das colônias do patógeno em relação ao crescimento apresentado pela testemunha (Tabela 2). A maior eficiência foi observada para o isolado ICB06, que reduziu 90 % o diâmetro da colônia de *Sclerotinia sclerotiorum*. Lobo Junior e Abreu (2000) observaram a inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* por metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma viride*, *T. aureoviride*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* e

*Penicillium* sp. Os mesmos autores ressaltam a importância de testar antagonistas em temperaturas próximas à temperatura ótima de desenvolvimento do patógeno, o que no caso de *S. sclerotiorum* está entre 15 e 20°C.

No teste de pareamento de culturas, 80% dos isolados testados reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli in vitro* (Tabela 2). Para esses isolados, a redução variou entre 29 e 50% em relação ao diâmetro da colônia da testemunha. Apenas 24 % dos isolados reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* (Tabela 2), entretanto, a eficiência desses isolados foi superior à encontrada para *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, uma vez que a redução provocada no crescimento do fitopatógeno variou entre 67,5 e 100% em relação à testemunha. O antagonismo de *Trichoderma stromaticum* foi observado em cultura pareada com *Phytophthora citrophthora*, reduzindo em 52,21% o crescimento do fitopatógeno, de acordo com Silva et al., 2008. Ethur et al. (2005) avaliaram a eficiência de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* no cultivo de pepineiro e observaram redução entre 94 e 100% no desenvolvimento do patógeno *in vitro*, e o controle do tombamento de mudas em estufa foi comprovado.

O potencial de espécies de *Trichoderma* atuarem com eficiência no biocontrole depende das condições físico-químicas do ambiente e não está fielmente associado a apenas um mecanismo, mas sim ao sinergismo que ocorre entre sua capacidade de produção de metabólitos voláteis e não voláteis tóxicos, competência rizosférica, competição por espaço e nutrientes, e produção de enzimas líticas, podendo acarretar não apenas a redução na incidência do patógeno, como provocar efeitos benéficos nas plantas, como promoção de crescimento (biofertilização) e estímulo dos mecanismos de defesa da planta (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004).

## Conclusões

Todos os isolados produziram enzimas hidrolíticas, ácido indol acético e sideróforos.

Os isolados testados apresentam maior eficiência na produção de metabólitos voláteis contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

O maior número de isolados foi capaz de inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. Pesq. Agrop. Gaúcha, v. 20, ns.1/2, p. 94-103, 2014.

*phaseoli in vitro*, entretando, os isolados capazes de inibir o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* foram mais eficientes.

## Referências

BAR-NESS, E.; HADAR, Y.; CHEN, Y. et al. Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. **Plant Physiology**, v.100, p. 451-456, 1992.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S. et al. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos de Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n. 2, p.18-24, 2001.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 28-34, 2011.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C. et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, p. 1579-1592, 2009.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENÍTEZ, T. et al. A novel endo beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 23, p. 6937-6945, 1995.

DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 33-38, 2003. DELGADO-JARANA, J.; MORENO-MATEOS, M. A.; BENÍTEZ, T. Glucose uptake in

- Trichoderma harzianum*: role of *gtt1*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 4, p. 708-717, 2003.
- DENNIS C.; WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v. 57, p. 363-369, 1971.
- DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELA, A. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews**, v. 9, p. 749-759, 2011.
- DUCA, D.; LORV, J.; PATTERN, C. L. et al. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie von Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85-125, Jul. 2014.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.
- GAJERA, H. P.; VAKHARIA, D. N. Production of litic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 43-52, 2012.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1968-1977, 2007.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v. 2, p. 43-56, 2004.
- HERMOSA, R.; VITERBO, A. ; CHET, I. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, n. 158, p. 17-25, 2012.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Diseases**, v. 87, n.1, p. 4-10, 2003.
- LEHNER, S. M.; ATANASOVA, L.; NEUMANN, K. N. et al. Isotope-assisted screening for iron-containing metabolites reveals a high degree of diversity among known and unknown siderophores produced by *Trichoderma* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 18-31, 2013.
- LIMA, G.; CASTORIA, R.; DE CURTIS, F. et al. Integrated control of blue mold using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, p.164-172, 2011.
- LOBO JÚNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 2, p. 521-526, 2000.
- MANDEL, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriological**, Natick, v. 79, p. 816, 1960.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 - 429, 1959.
- MONTEIRO, V. N. **Avaliação do perfil de proteínas secretadas pelo isolado de *Trichoderma harzianum* (ALL42) obtido de solo do Cerrado induzido por fitopatógenos**. Goiânia: UFG, 2008. 86 p. Tese (Doutorado em Biologia Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-15.
- PADMAJA, M.; NARENDRA, K.; SWATHI, J. et al. *In vitro* antagonism of native isolates from *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 886-891, 2013.
- Pesq. Agrop. Gaúcha, v. 20, ns.1/2, p. 94-103, 2014.

PEREIRA, M. J. Z.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 940-947, 2011.

QUALHATO, T. F.; LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolitic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 35, p.1461-1468, 2013.

RANA, I. A.; LOERZ, H.; SCHAEFFER, W. et al. Over expression of chitinase and chitosane genes from *Trichoderma harzianum* under constitutive and inducible promoters in order to increase disease resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Molecular Plant Breeding**, v. 3, n. 4, p. 37-44, 2012.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, I. S. **Proteolytic assay: a practical approach**. Oxford: IRC Press, 1989.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

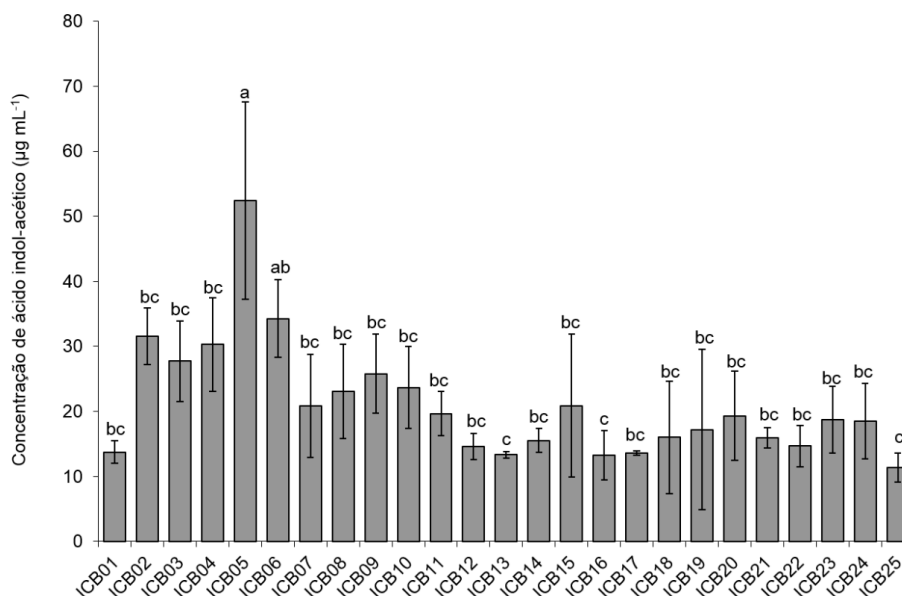
SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P. et al. Atividade antagonica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

ZANG, F.; YUAN, J.; YANG, X.; CUI, Y.; CHEN, L.; RAN, W.; SHEN, Q. Putative *Trichoderma harzianum* mutante promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. **Plant Soil**, v.368, p.433-444, 2013.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic-acid in plants. **Molecular Plant**, v. 5, n. 2, p. 334-338, 2012.

ZÚÑIGA, A.; POUPIN, M. J.; DONOSO, R. et al. Quorum sensing and índole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 5, p. 546-553, 2013.



**Figura 1 - Produção de ácido indol acético (AIA) por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. Barras seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente de acordo com o teste de Tukey 5%.**



**Tabela 1 - Produção de enzimas hidrolíticas por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*.**

Isolados	Enzimas hidrolíticas <sup>(1)</sup>		
	Quitinase (U) <sup>(2)</sup>	Glucanase (U) <sup>(2)</sup>	Protease (U) <sup>(3)</sup>
ICB01	9,58 <sup>e</sup>	7,06 <sup>ef</sup>	1,22 <sup>fgh</sup>
ICB02	10,93 <sup>cd</sup>	18,05 <sup>b</sup>	0,91 <sup>ijk</sup>
ICB03	11,51 <sup>c</sup>	6,80 <sup>efg</sup>	1,30 <sup>fg</sup>
ICB04	13,54 <sup>a</sup>	7,71 <sup>e</sup>	0,85 <sup>jk</sup>
ICB05	11,84 <sup>bc</sup>	12,93 <sup>cd</sup>	1,92 <sup>d</sup>
ICB06	10,51 <sup>de</sup>	5,37 <sup>fghi</sup>	3,41 <sup>a</sup>
ICB07	9,21 <sup>f</sup>	6,87 <sup>ef</sup>	1,30 <sup>fg</sup>
ICB08	11,57 <sup>c</sup>	14,48 <sup>c</sup>	2,50 <sup>b</sup>
ICB09	11,47 <sup>c</sup>	12,45 <sup>d</sup>	1,03 <sup>hij</sup>
ICB10	9,69 <sup>e</sup>	6,36 <sup>efgh</sup>	1,12 <sup>ghi</sup>
ICB11	9,61 <sup>e</sup>	13,05 <sup>cd</sup>	0,95 <sup>ijk</sup>
ICB12	8,69 <sup>g</sup>	5,10 <sup>ghi</sup>	0,95 <sup>ijk</sup>
ICB13	8,34 <sup>g</sup>	4,76 <sup>hi</sup>	1,67 <sup>e</sup>
ICB14	9,52 <sup>e</sup>	5,41 <sup>fghi</sup>	2,24 <sup>c</sup>
ICB15	9,94 <sup>e</sup>	4,08 <sup>i</sup>	0,99 <sup>hijk</sup>
ICB16	7,86 <sup>h</sup>	4,59 <sup>i</sup>	0,77 <sup>k</sup>
ICB17	9,88 <sup>e</sup>	6,64 <sup>efg</sup>	0,98 <sup>ijk</sup>
ICB18	9,69 <sup>e</sup>	5,34 <sup>fghi</sup>	1,01 <sup>hij</sup>
ICB19	8,57 <sup>g</sup>	25,62 <sup>a</sup>	0,83 <sup>jk</sup>
ICB20	9,08 <sup>f</sup>	4,48 <sup>i</sup>	0,87 <sup>jk</sup>
ICB21	12,67 <sup>ab</sup>	7,20 <sup>e</sup>	1,99 <sup>d</sup>
ICB22	9,80 <sup>e</sup>	6,96 <sup>ef</sup>	1,03 <sup>hij</sup>
ICB23	7,92 <sup>h</sup>	7,05 <sup>ef</sup>	0,98 <sup>ijk</sup>
ICB24	10,50 <sup>de</sup>	4,46 <sup>i</sup>	1,63 <sup>e</sup>
ICB25	8,16 <sup>h</sup>	12,98 <sup>cd</sup>	1,36 <sup>f</sup>
CV (%)	2,95	6,40	5,56

<sup>(1)</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente de acordo com o teste de Tukey 5%

<sup>(2)</sup> Uma unidade enzimática corresponde a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  glicose.  $(\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$

<sup>(3)</sup> Uma unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade.  $30 \text{ min}^{-1}$  em  $25^\circ\text{C}$  a  $\lambda = 440 \text{ nm}$

**Tabela 2 - Antagonismo e inibição de crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (*F. oxysporum*) e *Sclerotinia sclerotiorum* (*S. sclerotiorum*) por *Trichoderma* spp. e sua capacidade de produção de sideróforos.**

Isolados	Antagonismo		Inibição do crescimento por metabólitos voláteis		Produção sideróforos
	Média de crescimento da cultura do patógeno (cm)*				
	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	
ICB01	2,7 <sup>b</sup>	4,2 <sup>abcdef</sup>	3,7 <sup>abc</sup>	3,7 <sup>abcd</sup>	+
ICB02	1,9 <sup>b</sup>	1,9 <sup>cdef</sup>	4,0 <sup>ab</sup>	4,7 <sup>abcd</sup>	+
ICB03	2,7 <sup>b</sup>	6,1 <sup>abcd</sup>	3,4 <sup>abc</sup>	3,6 <sup>abcd</sup>	+
ICB04	2,6 <sup>b</sup>	0 <sup>f</sup>	3,5 <sup>abc</sup>	3,4 <sup>abcd</sup>	+
ICB05	2,7 <sup>b</sup>	3,4 <sup>abcdef</sup>	3,5 <sup>abc</sup>	2,2 <sup>bcd</sup>	+
ICB06	2,3 <sup>b</sup>	6,3 <sup>abc</sup>	3,5 <sup>abc</sup>	0,8 <sup>d</sup>	+
ICB07	2,0 <sup>b</sup>	3,9 <sup>abcdef</sup>	3,2 <sup>bc</sup>	4,8 <sup>abcd</sup>	+
ICB08	2,7a <sup>b</sup>	6,4 <sup>abc</sup>	3,4 <sup>abc</sup>	2,5 <sup>abcd</sup>	+
ICB09	2,8a <sup>b</sup>	7,2 <sup>ab</sup>	3,3 <sup>abc</sup>	3,4 <sup>abcd</sup>	+
ICB10	2,6 <sup>b</sup>	3,4 <sup>abcdef</sup>	3,4 <sup>abc</sup>	1,9 <sup>cd</sup>	+
ICB11	2,4 <sup>b</sup>	3,7 <sup>abcdef</sup>	3,2 <sup>bc</sup>	1,8 <sup>cd</sup>	+
ICB12	2,9 <sup>ab</sup>	8,0 <sup>a</sup>	3,2 <sup>bc</sup>	7,3 <sup>ab</sup>	+
ICB13	2,4 <sup>b</sup>	1,2 <sup>def</sup>	3,5 <sup>abc</sup>	5,0 <sup>abcd</sup>	+
ICB14	2,7 <sup>b</sup>	4,6 <sup>abcdef</sup>	3,9 <sup>abc</sup>	3,4 <sup>abcd</sup>	+
ICB15	2,3 <sup>b</sup>	4,7 <sup>abcdef</sup>	3,6 <sup>abc</sup>	5,9 <sup>abcd</sup>	+
ICB16	2,5 <sup>b</sup>	3,5 <sup>abcdef</sup>	3,2 <sup>bc</sup>	2,2 <sup>abcd</sup>	+
ICB17	2,5 <sup>b</sup>	5,9 <sup>abcde</sup>	3,5 <sup>abc</sup>	4,3 <sup>abcd</sup>	+
ICB18	2,4 <sup>b</sup>	1,0 <sup>ef</sup>	3,5 <sup>abc</sup>	3,3 <sup>abcd</sup>	+
ICB19	2,2 <sup>b</sup>	4,4 <sup>abcdef</sup>	3,7 <sup>abc</sup>	5,2 <sup>abcd</sup>	+
ICB20	2,6 <sup>b</sup>	6,3 <sup>abc</sup>	2,9 <sup>c</sup>	5,7 <sup>abcd</sup>	+
ICB21	2,8 <sup>ab</sup>	4,8 <sup>abcdef</sup>	3,2 <sup>bc</sup>	6,3 <sup>abc</sup>	+
ICB22	2,5 <sup>b</sup>	4,8 <sup>abcdef</sup>	3,7 <sup>abc</sup>	3,8 <sup>abcd</sup>	+
ICB23	2,8 <sup>ab</sup>	2,6 <sup>bcdef</sup>	3,5 <sup>abc</sup>	2,5 <sup>abcd</sup>	+
ICB24	2,6 <sup>b</sup>	3,3 <sup>abcdef</sup>	3,6 <sup>abc</sup>	3,4 <sup>abcd</sup>	+
ICB25	2,4 <sup>b</sup>	2,4 <sup>bcdef</sup>	3,4 <sup>abc</sup>	2,1 <sup>bcd</sup>	+
Testemunha	3,8 <sup>a</sup>	8,0 <sup>a</sup>	4,3 <sup>a</sup>	7,7 <sup>a</sup>	
CV (%)	12,96	37,30	9,19	44,25	

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente de acordo com o teste de Tukey 5%.