

39327

MURILLO LOBO JUNIOR

EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR  
ALGUNS FUNGOS ANTAGONISTAS "IN VITRO" NO CRESCIMENTO MICELIAL  
DE *SCLEROTINIA SCLEROTIRUM* (LIB.) DE BARY

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitossanidade, sub-área Fitopatologia para obtenção do grau de "Mestre".

Orientador: Mário Sobral de Abreu

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

DATA

1995

Lobo Junior, Murillo

Efeito de compostos voláteis e não voláteis produzidos por alguns fungos antagonistas "in vitro" no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary / Murillo Lobo Junior. -- Lavras : UFLA, 1995. 53p. : il.

Orientador: Mário Sobral de Abreu.

Dissertação (Mestrado) - UFLA

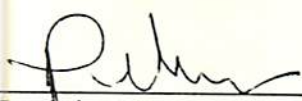
Bibliografia.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. *Trichoderma* sp. 3. *Penicillium* sp. 4.  
Controle Biológico. 5. Antibiose. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

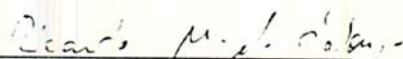
CDD-632.44

EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR  
ALGUNS FUNGOS ANTAGONISTAS "IN VITRO" NO CRESCIMENTO  
MICELIAL DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY.

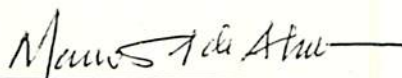
Aprovada em 22 de fevereiro de 1995



Prof. José da Cruz Machado



Prof. Ricardo Magela de Souza



Prof. Mário Sobral de Abreu  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida.

A meus pais e irmãos, por todo carinho e amor durante esta caminhada.

Ao Professor Mário Sobral de Abreu, pelos ensinamentos, amizade, convívio e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade da UFLA, em especial aos professores José da Cruz Machado e Ricardo Magela de Souza, pelos ensinamentos, inúmeras sugestões e apoio.

A todos os muitos amigos que fiz neste período, em especial a Adriane Vieira Reis, Angela Pimenta Perez, Carlos Antônio Medeiros, Regina Melo Sartori Coelho e Wilson da Silva Moraes.

A meus companheiros de República Ivan Antônio dos Anjos (Boró), Jorge Tsutomu Hassuike e Adriano Maurício Gonçalves da Silva (Berinjela) pela amizade, apoio e solidariedade.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade da UFLA, pelos numerosos auxílios, amizade e paciência.

Aos meus companheiros de gestão 92/93 da Associação dos Prós-Graduandos da UFLA.

À UFLA e CAPES, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMO .....   | 01 |
| SUMMARY.....   | 03 |
| CAPÍTULO 1 .....   | 05 |
| 1 - INTRODUÇÃO.....  | 05 |
| 1.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO FEJJOEIRO.....             | 05 |
| 1.1.2 PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS DO FEJJOEIRO NO BRASIL ..... | 06 |
| 1.2 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO FEJJOEIRO NO BRASIL .....      | 07 |
| BIBLIOGRAFIA .....   | 08 |
| <br>   |    |
| CAPÍTULO 2 .....   | 09 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO .....                                  | 09 |
| 2.1 MÔFO BRANCO DO FEJJOEIRO .....                           | 09 |
| 2.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS .....           | 12 |
| 2.2.1 FUNGOS ANTAGONISTAS .....                              | 12 |
| 2.2.2 MODOS DE AÇÃO DE ANTAGONISTAS .....                    | 13 |
| 2.2.3 ANTIBIOSE .....  | 14 |
| 2.2.3.1 COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS.....                          | 15 |
| 2.2.3.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS.....                              | 17 |
| 2.2.4 ERROS E ACERTOS DO CONTROLE BIOLÓGICO .....            | 18 |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| BIBLIOGRAFIA.....                | 20 |
| <br>                             |    |
| CAPÍTULO 3 .....                 | 27 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS .....       | 27 |
| 3.1 COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS ..... | 27 |
| 3.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS .....     | 30 |
| BIBLIOGRAFIA .....               | 32 |
| <br>                             |    |
| CAPÍTULO 4 .....                 | 33 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 33 |
| 4.1 COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS ..... | 33 |
| 4.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS .....     | 36 |
| BIBLIOGRAFIA .....               | 39 |
| <br>                             |    |
| CONCLUSÃO GERAL .....            | 41 |
| <br>                             |    |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....          | iv |
| <br>                             |    |
| ÍNDICE DE QUADROS .....          | v  |

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Vista lateral de placa de petri preparada para o teste de verificação de produção de compostos não voláteis ..... 43
- Figura 2: Diâmetro (médias não transformadas) de colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* cinco dias após contato com compostos não voláteis dos antagonistas *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* e *T. pseudokoningii* T26 e *Penicillium* sp. P1. .... 45
- Figura 3: Diâmetro de colônias de *S. sclerotiorum* após 5 dias de crescimento em meio com compostos não voláteis dos antagonistas, considerando a interação entre isolados e temperaturas. Os antagonistas utilizados foram *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* e *T. pseudokoningii* T26 e *Penicillium* sp. P1. ....46
- Figura 4: Diâmetro de colônias de *S. sclerotiorum* considerando a interação entre isolados e pH, no teste de produção de compostos não voláteis, pelos antagonistas *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* e *T. pseudokoningii* T26 e *Penicillium* sp. P1. ....47
- Figura 5: Vista lateral de placa de petri preparada para teste para a produção de compostos voláteis ..... 48

## ÍNDICE DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1: Análise de variância do experimento de produção de compostos não voláteis<br>.....  | 44 |
| Quadro 2: Análise de variância do experimento de produção de compostos voláteis. ....   | 49 |
| Quadro3: Diferenças entre médias de diâmetro de colônias de <i>S. sclerotiorum</i> considerando a interação entre isolados e temperaturas do experimento de produção de compostos voláteis dos antagonistas <i>Trichoderma viride</i> TR2, <i>T. aureoviride</i> T10, <i>T. koningii</i> e <i>T. pseudokoningii</i> T26 e <i>Penicillium</i> sp. P1. .... | 50 |



## RESUMO

**LOBO JR., M. EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR ALGUNS FUNGOS ANTAGONISTAS “IN VITRO” NO CRESCIMENTO DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY. LAVRAS, UFLA, 1995. 53p. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO (AGRONOMIA - FITOSSANIDADE).**

Práticas culturais e tratamentos químicos não têm sido eficientes no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofó branco do feijoeiro. Assim sendo, o controle biológico torna-se uma opção interessante que merece maiores investigações. Vários fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas têm a informação genética para sintetizar diversos metabólitos capazes de promover a fungistase. Estes metabólitos podem ser de natureza volátil ou não volátil, sendo que os primeiros têm a vantagem de maior facilidade de difusão no ambiente solo, através de poros ou filmes d'água. O principal modo de ação de muitos antagonistas é a antibiose, produção de metabólitos por microorganismos que são deletérios ao crescimento ou atividades metabólicas de outros organismos. Foi avaliada a produção “in vitro” de metabólitos não voláteis para quatro isolados de *Trichoderma* spp. e *Penicillium* sp. P1 levando em conta sua eficiência em diferentes temperaturas e pH's. De modo geral os resultados foram satisfatórios para todos os isolados exceto para P1, quando se avaliou a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* S1.

Todos os isolados tiveram sua eficiência severamente afetada em temperaturas abaixo de 20 °C, o que é indesejável uma vez que a temperatura ótima para o patógeno varia de 15 a 21 °C em condições de campo. Outras interações foram observadas, mostrando a interdependência entre os fatores analisados.

Foi testada também a inibição do crescimento micelial do isolado S1 de *Sclerotinia sclerotiorum*, patogênico à cultura do feijoeiro, sob condições controladas de diferentes temperaturas e diferentes pH's, através da produção de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* T15, *T. pseudokoningii* T26 *Penicillium* sp. P1. Todos os isolados testados produziram metabólitos voláteis que inibiram o isolado S1. Sob o ponto de vista estatístico, não houve diferença entre os antagonistas considerando a inibição do patógeno, ao n.m.s. de 5%. Outros tratamentos, como temperaturas e a sua interação com os isolados mostraram diferenças altamente significativas.

Palavras chave: Controle biológico, antibiose, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp.

## SUMMARY

### EFFECT OF VOLATILE AND NON VOLATILE COMPOUNDS PREODUCED BY SOME ANTAGONIST FUNGI "IN VITRO"ON MICELIAL GROWING OF *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB) DE BARY

Cultural practises and chemical treatment are not succesfull to control *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of white mold in bean culture. So, biological control is an interesting option that deserves more investigations. The main weapon of most antagonists is antibiosis, the production of methabolites by microrganisms wich are deleterious for other organisms growth or metabological activities. Many fungi used on biological control of plant pathogens have genetic information to sinthethise several methabilites able to promote fungistasis. These methabolites may be of volatile or non volatile nature, and the former have have the advantage of difusion on soil enviroment, through soil pores or water films. The production of non-volatile metabolites was tested for four *Trichoderma* spp. isolates and *Penicillium* sp. P1 also testing their efficiency in several temperatures and pH media. Most results were satisfactory except for P1 isolate, in relation to inibition of micelial growing of *S. sclerotiorum* S1 isolate. All isolates had their efficiency markedly reduced when temperatures below 20 °C were tested, what is not desirable once best temperatures for the pathogen in field conditions are between 15 and 21 °C in field conditions. Other interactions were found, showing interdependency between the given factors.

It was also tested the inhibition of micelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* S1 isolate pathogenic to common bean culture in controlled conditions of different temperatures

and different pH's by volatile metabolites produced by the isolates *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* T15 e *T. pseudokoningii* T26 and *Penicillium sp.* P1. All isolates produced volatile metabolites that inhibited S1 isolate growth. By the statistical point of view there were no differences between the antagonists considering the pathogen's inhibition. at 5% m.s.1. Other treatments as temperatures and their interaction with the isolates showed differences highly significant.

Key words: Biological control, antibiosis, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO**

#### **1.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO FEIJOEIRO**

#### **1.2 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO FEIJOEIRO NO BRASIL**

O feijão é um dos pratos preferenciais do brasileiro e seu mercado consumidor apresenta contínua expansão, mas o seu cultivo ainda tem caráter de subsistência na maioria das áreas cultivadas. As técnicas de cultivo são simples, rudimentares, mas em algumas regiões como o Alto Paranaíba - MG, Guaira - SP e norte do Estado do Paraná, há plantios mais tecnificados e economicamente mais organizados, utilizando inclusive irrigação por aspersão, e sua produtividade pode chegar até 3000kg/ha (Vieira, Vieira e Ramos, 1993).

Apesar do Brasil ser o maior produtor mundial de feijão (Vieira, Vieira e Ramos, 1993), com sua produção anual em torno de 2.000 toneladas/ano, sua produção destina-se ao mercado interno, pois sua produção mantém-se estacionária desde 1965 (Vieira, 1988); o que faz com que o país tenha que recorrer periodicamente a importações deste produto. Assim, se persistir a tendência de estabilização na produção de feijão, o brasileiro poderá sofrer uma deterioração na qualidade de sua alimentação, pelos menos as classes sociais mais simples, mais dependentes de proteína de origem vegetal.

Segundo Vieira (1988), a pesquisa agrícola tem dado maior atenção aos cereais negligenciando de certa maneira as leguminosas de grão, o que reflete na pouca literatura disponível e atualizada, inclusive às doenças e seu manejo. Entretanto, as perspectivas

nacionais e mundiais para a cultura do feijoeiro e outras leguminosas de grão são boas, porquanto seu cultivo, aceitabilidade e consumo estão bem estabelecidos, adaptam-se diferentes condições climáticas, e constituem fonte barata de proteína.

Apesar de sua importância econômica e social, a produtividade da cultura do feijoeiro no Brasil é muito baixa, sendo em torno de 450 kg/ha (Vieira, Vieira e Ramos, 1993), inclusive no Estado de Minas Gerais. As doenças de origem infecciosa (fungos, bactérias, vírus e nematóides) e não infecciosa (deficiências nutricionais) constituem um dos fatores mais importantes do baixo rendimento na cultura do feijão (Zambolim, Chaves e Martins, 1982).

### **1.1.2 PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS DO FEIJOEIRO NO BRASIL:**

As doenças causadas por fungos são as de ocorrência mais comum no Estado de Minas Gerais (Zambolim, Chaves e Martins, 1982) sendo o seu controle através de variedades resistentes é dificultado devido ao grande número de raças fisiológicas que a maioria dos patógenos apresentam. O controle destas doenças por fungicidas também é difícil principalmente no caso de patógenos que sobrevivem no solo, formando estruturas de resistência.

O controle químico também apresenta outros problemas, como riscos à saúde do operador do tratamento, além da interferência no equilíbrio ecológico na área de plantio, podendo selecionar certos patógenos, erradicar antagonistas, exercendo assim uma pressão de seleção sobre certos organismos (Cardoso, 1991). Segundo Bruehl (1989), o uso de pesticidas pode ser avaliado como uma medida de progresso ou falta dele.

A grande maioria dos patógenos do feijoeiro são veiculados pelas sementes e muitos deles apresentam uma alta capacidade de atuação no solo, podendo permanecer viáveis na ausência de hospedeiros por longos períodos de tempo. A incidência de fungos em sementes pode representar, segundo Illipronti Jr. (1991), uma séria ameaça já no início de implantação da cultura.

Neste estudo deu-se atenção especial a um patógeno de crescente importância na cultura do feijoeiro, principalmente em culturas irrigadas em áreas de clima ameno ou frio: *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofô branco do feijoeiro, que uma vez estabelecido em uma determinada área, é difícil de ser manejado economicamente.

**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

- BRUEHL, G. W. Integrated control of soil-borne plant pathogens: An overview. Canadian Journal of Plant Pathogen. Guelph, v.11, p.153-157, 1989
- CARDOSO, J. E. Controle de patógenos de solo na cultura do feijão. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 3, Campinas, 1991, Anais... Campinas, 1991, p.45-50.
- ILLIPPRONTI JR., R. A. Efeitos antagônicos de fungos procedentes da região do Alto-Paranaíba - MG, em relação a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, em soja (*Glycine max* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). ESAL. 1991, 70p. (Dissertação, Mestrado em Agronomia-Fitossanidade).
- VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: UFV, 1988, 213p.
- VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J. A. O. Produção de sementes de feijão. Viçosa: EPAMIG, 1993, 131p.,
- ZAMBOLIN, L.; CHAVES, G. M.; MARTINS, M. C. P. Aspectos das principais doenças do feijão no Estado de Minas Gerais. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, v.8, n.88, p.20-29, 1982



## CAPÍTULO 2

### 2 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.1 MÔFO BRANCO DO FEIJOEIRO

*Sclerotinia sclerotiorum* é um patógeno que causa danos em muitas plantas de interesse econômico, sendo que Vieira (1988) menciona que há 374 espécies suscetíveis dentro de 237 gêneros e 65 famílias. O patógeno está disseminado por muitos países de todos os continentes (Purdy, 1979; Lumsden, 1979) e seus danos manifestam-se com maior severidade em áreas com clima úmido associado a alta umidade relativa. No Brasil perdas na produção de diversas culturas causadas por *S. sclerotiorum* vem chamando atenção, como o caso de lavouras de feijão e soja irrigadas por pivô central em diversas regiões do país.

Quando ataca o feijoeiro, *Sclerotinia sclerotiorum* causa a doença conhecida como murcha de esclerotinia ou podridão aquosa (Vieira, 1967, 1983). A doença se manifesta na haste, folhas, e vagens, começando geralmente pelas partes mais próximas do solo, na forma de manchas aquosas que evoluem para podridão mole. Tecidos afins são então afetados pelo crescimento micelial do patógeno, que gradualmente forma massas compactas inicialmente claras e finalmente pretas, de dimensões variáveis mas visíveis ao olho nu, os escleródios, estruturas muito resistentes às interperies. Dependendo do local a planta pode amarelecer e morrer. Vieira (1967, 1983) cita que as sementes infectadas pelo

fungo tornam-se sem brilho, com aparência cor de diz, e são mais leves do que as sementes normais. Escleródios podem estar associados às sementes.

*Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) de Bary (*Whetzelinia sclerotiorum* (De Bary) Korf e Dumont) é um Ascomiceto que pode sobreviver principalmente na forma de escleródios, que podem permanecer viáveis no solo por vários anos. Sob determinadas condições o escleródio pode germinar dando origem a um ou mais órgãos em forma de taça, os apotécios. A partir dos apotécios são formados milhares de ascosporos, que são facilmente disseminados pelo vento devido a um mecanismo de ejeção violenta dos ascosporos pelo fungo. O inóculo primário é constituído pelo micélio que se desenvolve a partir dos escleródios presentes no solo ou pelos ascosporos, trazidos pelo vento (Kimati, 1980).

Em plantios de feijão irrigados por aspersão comum ou pivô central, podem ocorrer altas incidências de mofa branca. Em regiões caracterizadas por temperaturas amenas, que somadas à alta umidade relativa formada pela irrigação, forma-se um microclima altamente favorável à incidência de epifitias deste patógeno e sua disseminação. Hoje, com o uso intensivo de pivô central, necessita-se de dados relacionando seu uso intensivo com o progresso de doenças (Maffia et al, 1988). Como principais conseqüências notam-se grandes perdas na produção e o abandono de áreas de plantio contaminadas.

O controle químico do mofa branca é questionável, não tendo se mostrado eficiente para o controle desta enfermidade, pois os resultados têm se mostrado inconsistentes com o tempo (Cardoso, 1991). Entre as dificuldades que contribuem para o insucesso do controle químico destacam-se a longevidade das estruturas de resistência dos patógenos, a habilidade do patógeno infectar o hospedeiro por longos períodos, o sítio de

infecção abaixo do solo, o custo de aplicação e a baixa eficiência de fungicidas para erradicar os escleródicos e restos de cultura (Ghini, 1991).

Levando em conta esta deficiência, faz-se necessária a busca de novas estratégias de controle, como o controle biológico e/ou controle integrado de doenças. Estas estratégias devem ser comprovadas cientificamente, não se limitando a métodos empíricos para o controle de enfermidades em plantas. Dentre os diversos fatores que podemos manipular, encontram-se os relacionados ao controle biológico de plantas e sua integração com outros métodos, no que se refere ao manejo integrado de doenças.

O componente do solo mais importante afetando a sobrevivência de escleródios no solo é, de acordo com Adams e Ayers (1979), parece ser o biológico, havendo mais de 30 espécies de fungos e bactérias relacionadas por vários autores como sendo antagonistas ou microparasitas de *Sclerotinia* spp., segundo Steadman (1979). Entre os muitos organismos com potencial de serem utilizados no controle biológico de doenças de plantas, os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium* têm sido destacados positivamente, havendo vários casos citando o antagonismo de *Trichoderma* e *Penicillium* parasitando escleródios de *Sclerotinia* sp. (Adams e Ayers, 1979).

Há a necessidade de se identificar e explicar diversos fatores biológicos, químicos e físicos ligados à atividade e eficiência de antagonistas, patógenos e saprófitas e plantas hospedeiras quando se testam tratamentos biológicos para a proteção contra doenças.

## 2.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS

### 2.2.1 FUNGOS ANTAGONISTAS

Entre os fungos utilizados como agentes de biocontrole mais conhecidos, encontram-se espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*. Espécies do gênero *Trichoderma* são conhecidas como antagonistas a mais de cinquenta anos, e os trabalhos atuais concentram-se na identificação de raças específicas, aplicação e eficiência.

O gênero *Trichoderma* é o agente de biocontrole mais estudado até o momento, sendo capaz de parasitar diferentes patógenos, como os gêneros *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Aphanomyces*, *Fusarium*, *Cochliobulus*, *Macrophomina*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Verticillium* (Liu, 1993; Martins, 1988; Melo, 1991; Singh et al., 1993; Fravel e Keinath, 1991). As diversas espécies de *Trichoderma* têm sido associadas a solos supressivos a fitopatógenos (Reis, 1991).

Por definição, antibióticos são substâncias orgânicas produzidas por microrganismos e são deletérias em concentrações baixas ao crescimento ou atividade metabólicas de outros microrganismos (Baker e Cook, 1974), podendo ser específicos ou de amplo espectro de ação. Entre os efeitos observáveis nota-se a redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise (Campbell, 1989).

## 2.2.2 MODOS DE AÇÃO DE ANTAGONISTAS

Em condições naturais quando ocorre uma elevada taxa de mortalidade de patógenos e baixa incidência de doenças, estes eventos são resultantes do somatório de diversas formas de estresses biológicos dos propágulos, através de parasitismo, competição por nutrientes e espaço físico e antibiose (Papavizas e Lumsden, 1980; Hornby, 1983), ou ainda em função da diminuição das reservas internas do patógeno causada por vários estresses subletais impostos por uma microbiota associada. O somatório destes fatores leva à fungistase, e todos estes temas vem recebendo atenção crescente. Várias perguntas tem sido feitas sobre os mecanismo de fungistase ou supressão de doenças (Rouxel, 1991). Quando os microrganismos antagônicos agem? Como eles agem? Quais seus efeitos no patógeno?

Metabólitos antifúngicos exercem um grande papel no antagonismo e afetam a sobrevivência de microrganismos no solo (Melo, 1991). Estes metabólitos muitas vezes são produzidos por microrganismos que sobrevivem no solo, principalmente fungos, bactérias e actinomicetos. Dentre os fungos que possuem informação genética para a produção de antibióticos, destacam-se os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*.

Os primeiros trabalhos científicos provando a produção de antibióticos por *Trichoderma* foram realizados por Weindling (1934), que conseguiu identificar os antibióticos gliotoxin e viridin, estáveis somente em solução ácida. Dennis e Webster (197a, b) demonstraram que diversos isolados do gênero *Trichoderma* eram capazes de produzir metabólitos voláteis e não voláteis, inibindo o crescimento de vários fungos.

### 2.2.3 ANTIBIOSE

Para et al. (1987) antibióticos são produtos do metabolismo secundário de seus produtores e evidências convincentes para a produção de antibióticos no solo não estão próximas de serem esclarecidas, ou seja, a presença de tais compostos nesse ambiente baseia-se grandemente em suposições. Substâncias antibióticas são possivelmente mais importantes na inibição do crescimento de hifas ativamente na competição ativa por nutrientes, ou ainda, na germinação de conídios (Liu, 1993). Tal competição seria mais intensa durante a exploração de áreas localizadas com alto teor de compostos orgânicos, ou seja, onde há nutrientes em excesso (Baker e Cook, 1974) como sementes e o ambiente da rizosfera (apesar destes nichos também favorecerem patógenos), e deste modo a produção destas substâncias antibióticas seria realizada em concentrações suficientes para afetar o crescimento de outros fungos.

Em relação à antibiose, esta pode ser definida como a inibição de um organismo pelo produto metabólico de outro (Baker e Cook, 1974), e apesar de ser normalmente uma inibição de crescimento, pode ser em alguns casos letal. Por sua vez, antibióticos são substâncias orgânicas produzidas por microrganismos e são deletérios em concentrações baixas ao crescimento ou atividades metabólicas de outros microrganismos (Baker e Cook, 1974; Hornby, 1983; Campbell, 1989). Antibióticos podem ser específicos ou ter amplo espectro de ação, e entre seus efeitos observáveis nota-se a redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise (Campbell, 1989). A antibiose tem vantagens sobre outras formas de antagonismo, como difusão em filmes d'água e por poros no solo ou substrato, zonas de influência,

maiores do que o volume do organismo, sendo assim mais eficientes do que competidores ou parasitas. No campo, antibióticos raramente têm sido identificados “in situ” (Mangenot e Diem, 1979), o que tem levado normalmente à sua detecção em laboratórios.

De modo geral fungos têm recebido maior atenção do que bactérias por sua facilidade de manipulação. Dentre a diversidade de fungos estudados no controle biológico de doenças de plantas por formarem antibiose, podemos destacar os gêneros *Trichoderma*, *Glucadium* e *Penicillium*, todos capazes de produzirem antibióticos de largo espectro.

### **2.2.3.1 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS**

Para e Allan (1987) evidências convincentes para a produção de antibióticos no solo não tem sido satisfatórias, e a presença de tais compostos nesse ambiente baseia-se grandemente em suposições. Numerosos fatores bióticos e abióticos podem afetar a extensão e fatores de crescimento de agentes de biocontrole (Baker e Cook, 1974).

Substâncias antibióticas são possivelmente mais importantes na inibição de hifas crescendo ativamente na competição ativa por nutrientes. Tal competição seria mais intensa durante a exploração de áreas localizadas de alto teor de carbono orgânico, que é também quando substâncias antibióticas têm maior probabilidade de serem produzidas em concentrações suficientes para afetar o crescimento de outros fungos. Estas substâncias podem ser ou não estáveis resistentes a quebras e à inativação química e biológica. Métodos indiretos têm sido usados, envolvendo substâncias permeáveis à água do solo, como o papel celofane (celulose recuperada), operando por difusão de substâncias fungistáticas do solo para o meio de ensaio. Michereff, Menezes e Mariano (1993) utilizando a técnica do papel

celofane verificaram o efeito de metabólitos não voláteis de 5 isolados de diferentes espécies de *Trichoderma* sp. sobre *Colletotrichum graminicola*, sendo que o maior efeito inibitório foi produzido por *Trichoderma koningii*.

Michereff, Menezes e Mariano (1993) especulam que a capacidade de inibição de crescimento por metabólitos não voláteis pode ser causada, além de pela variabilidade genética, por equilíbrio nutricional do meio, pH e temperatura. Espécies de *Trichoderma* sp. crescem bem em pH baixo (Luz 1993). O parasitismo de *Armillaria mellea* por *Trichoderma* spp. foi substancialmente reduzido quando ajustou-se o pH do meio abaixo de pH 5,1, e inibido quando o pH ficou acima de 7,0 (Boosalis, 1964).

Dentre os diversos fatores que afetam o crescimento e metabolismo dos microrganismos, um dos mais importantes é a temperatura, fator que nem sempre é considerado quando se avaliam antagonistas em potencial. Estudos como os de Dennis e Webster (1971 a,b,c) e Illipronti Jr. (1991) foram conduzidos em temperaturas de 20 °C, que Tronsmo e Dennis (1978) consideram como artificialmente altas para muitas situações naturais. De 54 isolados de diferentes espécies de *Trichoderma* sp., 32 foram capazes de crescer a 2 °C, 48 a 5 °C e todos cresceram entre 10 e 20 °C.



### 2.2.3.2 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Estes metabólitos voláteis têm vantagens sobre aquelas não voláteis (Mangenot e Dien, 1979), como a capacidade de difusão em interstícios assim como na solução do solo quando voláteis em água. São somente sujeitos à absorção e biodegradação e seu efeito é somente limitado por diluição. A natureza volátil de certos antibióticos como as pironas produzidas por *Trichoderma hardianun* ( et al, 1987) e por *T. koningii* (Simon et al., 1988) confere uma vantagem distinta sobre inibidores não voláteis desde que microrganismos fisicamente distantes dos sítios de produção são provavelmente afetados. A permeação por inibidores não voláteis vai ser altamente restrita, especialmente para metabólitos de baixa solubilidade em água.

Tamimi e Hutchinson (1975) investigaram diferenças na produção e atividades de gases produzidos pelos isolados de *Trichoderma* utilizados por Dennis e Webster (1971 a, b, c), com auxílio de cromatografia a gás-líquido. Foram detectados acetaldeído, acetona, etanol e dióxido de carbono, sendo este último encontrado em concentrações muito maiores do que os demais. Assim, especulou-se sobre o CO<sub>2</sub>, como sendo o responsável pela inibição de diversos fungos testados. Mangenot e Diem (1979) tecem algumas considerações a respeito da atuação de dióxido de carbono, etileno e amônia, a saber: O CO<sub>2</sub> é uma das substâncias voláteis mais estudadas e seus efeitos em fungos são bastante variáveis, podendo ser estimulantes ou inibitórios, o mesmo ocorrendo com a amônia. Já o etileno não é inibitório mas facilita a formação de derivados como o alil-álcool, que é inibidor. Entre os metabólitos voláteis também há gases como etileno e cianeto de

hidrogênio (Campbell, 1989), que afetam o crescimento microbiano; estes gases são ativos a baixas concentrações mas não são considerados como antibióticos.

Isolados de *T. koningii* e *T. viride* inibiram o crescimento de *Verticillium dahlie* pela produção de metabólitos voláteis (Martins, 1988), além destes serem inibidos pelos seus próprios metabólitos.

#### **2.2.4 ERROS E ACERTOS DO CONTROLE BIOLÓGICO**

Apesar da vasta literatura disponível sobre os diversos temas que envolvem o controle biológico de doenças de plantas, há uma carência estudos específicos a respeito de antibiose e de resultados práticos a nível de campo. O ponto crítico da introdução de antagonistas em solo não esterilizado é a competição com a microflora já presente no solo (Metzler, 1991). A falta de formulações de microrganismos ou de substratos adequados para o crescimento e aplicação destes em condições de campo é uma das maiores barreiras às pesquisas de controle biológico de plantas (Melo, 1991), contribuindo para que na maioria das vezes, somente um controle parcial da doença seja atingido. Assim, o controle biológico, como única forma de controle não tem substituído outros métodos, mas nem por isso deixando de ser como um importante complemento para outras medidas (Henis e Chet, 1975).

A microbiolização de sementes é o maior sucesso de controle biológico de doenças de plantas até o presente (Luz, 1991), sendo o meio mais eficiente de se introduzir antagonistas, provavelmente porque são colocados em um ambiente favorável, a espermosfera. O revestimento de sementes com antagonistas microbianos, além de controlar

patógenos na espermosfera, controla também patógenos que sobrevivem no solo. Machado (1988) indica fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Gliocadium* e *Chaetomium* como promissores no tratamento biológico de sementes contra fungos fitopatogênicos.

Antagonistas quando aplicados a sementes podem promover a proteção durante a germinação, emergência, emissão de raízes e brotos, ou seja, seu objetivo é o mesmo do tratamento químico. Em adição, é esperado que ocorra a colonização da rizosfera ou superfície das raízes e assim promover proteção a ambos, raízes e sementes.

**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

- ADAMS, P. B.; AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopatology, St. Paul v.69, n.8, p.689 - 899, 1979
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. Biological control of plant pathogens. New york, W. H. Freeman and Co., 1974, 433p.
- BOOSALIS, M.G. Hyperparasitism. Annual Review of Phytopathology. Palo Alto, v.2, p.363 - 376, 1964.
- CAMPBELL, R. Biological control of microbial plant pathogens. Sidney, C.U.P, 1989, 218p.
- CARDOSO, J. E. Controle de patógenos de solo na cultura do feijão. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 3, Campinas, 1991, Anais...Campinas, p.45-50.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R.; AVENT, A. G. Antifungal alkyl - pyrones produced by *Trichoderma harzianum*. Transactions of the British Mycological Society, London, v.88, n.4, p.503 - 513, 1987.

- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* 1- Production of non volatile metabolites. Transactions of the British Mycological Society, London, v.57, n.1, p.25 -39, 1971.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* 2- Production of volatile metabolites. Transactions of the British Mycological Society, London, v.57, n.1, p.41-48, 1971.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 3- Hiphal Interaction. Transactions of the British Mycological Society, London, v.57, n.1, p.363-369 , 1971.
- FRAVEL, D. R. The role of antibiosis on the biocontrol of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v26, p.75-91 ,1988.
- GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (ed.) Controle Biológico de Doenças de Plantas, Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1991, p. 201-217.
- HENIS, Y. ; CHET, I. Microbiological control of plant pathogens. Advances in Applied Microbiology, Cambridge, v.19, p.85-111, 1975

- HORNBY, D. Suppressive soils. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.21, p.65-85, 1983.
- ILLIPRONTI JR., R. A. Efeitos antagônicos de fungos procedentes da região do Alto-Paranaíba - MG, em relação a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary, em soja (*Glycine max* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: ESAL, 1991. 70p. (Dissertação, Mestrado em Agronomia-Fitossanidade).
- KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: Galli, F. (ed.) Manual de fitopatologia, Doenças das plantas cultivadas, Piracicaba, Ceres, v.2, 1980, p.297-318.
- LIU, S. D. The screening of antagonistic organisms against gray mold disease of strawberry and their biocontrol effect. Plant Protection Bulletin, Taipei, v.35, n.2, p. 105-115, 1993.
- LUMSDEN, R. D. Histology and physiology pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. Phytopathology, St. Paul, v. 69, n.8, p. 890-895, 1979
- LUZ, W. C. Controle biológico de doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W. (ed.) Controle Biológico de doenças de plantas, Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1991. p.25-31
- MACHADO, J. C. Patologia de sementes, Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 106p.

- MAFFIA, L. A. Fundamentos epidemiológicos no estudo da transmissão de patógenos por sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3, Lavras, 1988. Anais... Lavras, Fundação Cargill, 1988, p.114-122.
- MANGENOT, F ; DIEM, H.G. Fundamentals of biological control. In: KRUPA, S.V.; DOMMERGUES, Y. R. (eds.). Ecology of root pathogens. New York: Elsevier, 1979 p.207-265.
- MARTINS, M. P. Potencial antagônico de espécies de Trichoderma contra *Verticillium dahliae* em berinjela (*Solanum melongena* L.). Piracicaba: ESALQ-USP, 1988, 156p. (Dissetação de Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- MELO, I. S. Potencialidades na utilização de Trichoderma spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (ed) Controle biológico de doenças de plantas Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1991 p.135-156.
- METZLER, B. Application, nutritional factors, population dynamics and detection of antagonists. In: BEEMSTER, A. R. B. ;BOLLEN, G. J.; GERLAGH, M. RUISSSEN, M. A.; SCHIPPERS, B. ; TEMPEL, A. Biotic interactions and soilborne diseases. New York: Elsevier, 1991. p. 160-164.

- MICHEREFF, S. J., MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. Summa Phytopatologica, Piracicaba, v.19 n.1, p.14-17, 1993.
- PAPAVIZAS, G. C. ; LUMSDEN, R. D. Biological control of soilborne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.18, p.389-412, 1980.
- PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and simptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathology, St. Paul, v.69, n.8, p.875-880, 1979.
- REIS, E. M. Solos supressivos e seu aproveitamento no controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (ed) Controle biológico de doenças de plantas Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1991 p.135-156.
- ROUXEL, F. Natural supressiveness of soils to plant disease. In: BEEMSTER, A. R. B. ; BOLLEN, G. J.; GERLAGH, M. RUISSEN, M. A.; SCHIPPERS, B. ; TEMPEL, A. Biotic interactions and soilborne diseases, New York: Elsevier, 1991 p. 160-164.
- SIMON, A.; DUNLOP, R.W.; GHISALBERTI, E.L.; SIVASITHAMPARAM, K. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.20, p.263-264, 1988.



SINGH, R. S.; NARINDER-SINGH, KANG, M. S.; SINGH, N. Rhizosphere mycoflora and their interaction with *Macrophomina phaseolina*. Indian Phytopatology, New Delhi, v.45, n. 1, p.39-43, 1993

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. Phytopathology, St. Paul, v.69, n.8, p.904-907, 1979

TAMIMI, K. M.; HUTCHINSON, S.A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. Transactions of the British Mycological Society, London, v.64, n.3, p.455-463, 1975.

TRONSMO, A.; DENNIS, C. Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. Transactions of the British Mycological Society, London, v.71, n.3, p.469 - 474, 1978.

VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: UFV, 1988. 213p.

VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: UFV, 1983, 213p.

VIEIRA, C. O feijoeiro comum. Viçosa: UFV, 1967. 220p.

WEINDLING, R. Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, St. Paul, v.24. n.11, p.1153-1179, 1934.

## CAPÍTULO 3

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados durante os meses de novembro de 1994 e janeiro de 1995 nos laboratórios de Clínica Fitopatológica e Patológica de Sementes, ambos localizados no Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados os isolados *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. Koningii* e *T. pseudokoningii* T26, procedentes da UFRPE - Pernambuco, mais os isolados *Penicillium* sp. P1 e *sclerotiorum* S1 (isolado de plantas de feijoeiro), provenientes da Micoteca do Departamento de Fitossanidade da UFLA.

#### 3.1 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

Quando se faz a seleção de antagonistas in vitro, alguns problemas podem surgir, como a não formação de halos de inibição em organismos produtores de antibiose. É o caso que ocorreu quando se fez o pareamento dos isolados *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* T15 e *T. pseudokoningii* T26 utilizados por Michereff et al. (1993) com o isolado S1 de *Sclerotinia sclerotiorum*, procedente da micoteca da UFLA.. Antagonistas e patógeno neste caso tiveram crescimento muito rápido, e o contato entre hifas foi observado após 72 horas. Por outro lado o isolado P1 de *Penicillium* sp. forma uma colônia densa e compacta, de crescimento lento. Quando pareado simultaneamente com *S. sclerotiorum* S1, o patógeno não foi inibido e estendeu suas hifas até a colônia de *Penicillium* sp. P1. Porém, se for colocado um disco de meio com micélio e esporos do

isolado P1 120 horas antes do disco com o isolado S1, verificar-se-á o esperado halo de inibição.

Para a realização deste experimento utilizou-se a técnica de Dennis e Webster (1971), que basicamente consiste em colocar um disco de meio com micélio e esporos sobre um filme ou membrana que impede o contato do antagonista com o substrato, porém permite o crescimento do fungo e liberação de metabólitos no substrato. Os seguintes passos foram realizados:

Como membrana foram utilizadas folhas de papel celofane, cortadas em pedaços de 12 x 12 cm. Para a esterilização das folhas estas foram intercaladas com folhas de papel usado para testes de germinação. todas as folhas envolvidas em papel alumínio e em seguida autoclavadas a 120° C e atm por 20 minutos.

O substrato utilizado foi o meio BDA (extrato de 200g de batatas cozidas + 12g de ágar + 12g de dextrose, para 1000 ml de água destilada), ao qual foi acrescida 1 gota do antibiótico chloranphenicol para cada 100ml de meio.

Para a obtenção de meios com os pH's 5,0, 6,0, e 7,0 foram utilizadas soluções 0,1M de HCL e 0,2 de NaOH, com auxílio de um pHmetro Korning modelo P-78.

Em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 20 ml de meio foram vertidos em cada placa de petri de 9 cm. Após a solidificação do meio colocou-se uma folha de celofane sobre a superfície do meio, com o auxílio de duas pinças flambadas. Para o celofane não soltar totalmente, ou em parte, da superfície do meio quando as placas foram fechadas, as bordas do celofane que ficaram para fora foram dobradas para baixo. Sobre o celofane já em contato com o meio foi colocado um disco de BDA com 8mm de diâmetro contendo esporos

e micélio no centro da placa. Finalmente as placas foram fechadas e lacradas com parafilme para evitar possíveis contaminações. O modelo utilizado pode ser visto na figura 1.

As placas com os antagonistas foram mantidas por 48 horas em incubadoras com ausência de luz e diferentes temperaturas, uma para cada tratamento. As temperaturas utilizadas foram de 10, 15, 20, 25 e 30°C  $\pm$  0,5°C. Após as 48 horas as placas foram levadas novamente à câmara de fluxo laminar para a retirada do celofane com os antagonistas, o que foi feito cuidadosamente para que não caíssem esporos no meio, com auxílio de duas pinças flambadas.

O passo seguinte foi a inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando-se um disco de 8 mm BDA com micélio do patógeno, no local antes correspondente ao antagonista.

Deste modo avaliou-se a inibição do crescimento micelial do fungo sobre o meio com os possíveis metabólitos de cada antagonista, sob diferentes condições de temperaturas e pH's do meio.

Como testemunha, esta constou da inoculação de um disco de 8 mm de BDA com micélio de *S. sclerotiorum* 48 horas após a colocação de uma folha de celofane sem qualquer antagonista. O delineamento utilizado dói inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento.

### 3.2 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Neste experimento utilizou-se a técnica indicada por Martins (1988) e Mariano (1993). O substrato utilizado foi o meio BDA (extrato de 200g de batatas cozidas + 12g de ágar + 12g de dextrose, completando-se com água destilada para se obter 1000ml de meio). Para se evitar contaminações bacterianas foi adicionado chloranphenicol, na proporção 1 gota do antibiótico/100 ml de meio. Para se ajustar o pH titulou-se o meio com soluções de 0,1M de HCl e 0,2M de NaOH, até obtenção de meios com pH 5,0 e 7,0.

Sob condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar, cerca de 20 ml de meio foi vertido em fundos de placas de petri de 9 cm de diâmetro. Após a solidificação do meio, os antagonistas foram inoculados da seguinte forma: Para as espécies de *Trichoderma* um disco de 8 mm com o antagonista foi colocado no centro da placa, ficando a face do disco com micélio e esporos voltada para a superfície do meio. Para *Penicillium* sp. P1, pegou-se com auxílio de um estilete flambado um disco de 8 mm de diâmetro de BDA com esporos e micélio, e assim este disco foi tocado em vários pontos do meio para espalhar seus esporos. A utilização desta metodologia de inoculação para *Penicillium* sp. visou o crescimento uniforme do isolado P1 sobre o meio, uma vez que o crescimento radial de sua colônia a partir de discos de meio BDA com micélio é bastante lento, quando comparada com os isolados de *Trichoderma*.

Quanto ao fechamento das placas, onde havia fundo de placas com meio mais o antagonista colocou-se outro fundo de placa. As placas foram seladas com parafilme e levadas à câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h luz/ escuro e temperatura de 20°C ± 2°C.

Após 7 dias as placas com os antagonistas já estabelecidos sobre o meio foram abertas em câmara asséptica para a realização do seguinte evento: A parte superior das placas era retirada e nestas era despejado cerca de 20 ml de BDA. Com a solidificação do meio colocou-se um disco de BDA de 8 mm de diâmetro com micélio de *S. sclerotiorum*. Novamente as placas foram fechadas e seladas com filme plástico (figura 2), e desta vez submetidas a diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C ± 1°C), em incubadoras com ausência de luz.

Cada tratamento continha 3 repetições mais a testemunha, e o experimento foi delineado inteiramente ao acaso. A avaliação foi feita quando o crescimento micelial do patógeno em placa sem antagonista alcançou os bordos da placa, o que ocorreu 5 dias após a inoculação.

## BILIOGRAFIA CONSULTADA

- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* 1-  
Production of non volatile metabolites. Transactions of the British Mycological Society,  
London, v.57, n.1, p.25-39, 1971.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de Seleção "In Vitro" Para o Controle Microbiológico de  
Patógenos de Plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v.1, p.360-  
409, 1993.
- MARTINS, M. P. Potencial antagônico de espécies de Trichoderma contra *Verticillium*  
*dahlie* em berinjela (*Solanum melongena* L.). Piracicaba, ESALQ-USP, 1988. 156p.  
(Dissertação, Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- MICHEREFF, S. J., MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de  
*Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em  
condições de laboratório. Summa Phytopatologica, Piracicaba, v.19 n.1, p.14-17, 1993.



## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

#### 4.1 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

Foi feito o teste de Tukey para avaliação dos isolados; e para pH, temperaturas e as diversas interações foi utilizada análise de regressão polinomial, com o nível máximo de significância de 5%. Os dados foram transformados segundo  $\sqrt{X+1}$ .

De acordo com o quadro de análise de variância (veja o quadro 1), nota-se uma série de interações entre os fatores, que foram altamente significativas.

Em se considerando o teste de Tukey para avaliação dos fungos antagonistas (quadro 2), observa-se claramente a notável diferença entre as médias dos diâmetros das colônias formadas. Ao nível máximo de significância de 5%, com exceção dos isolados *T. koningii* T15 e *T. pseudokoningii* T26, todos os isolados diferiram entre si. À exceção do isolado P1 de *Penicillium* sp. que praticamente não exerceu nenhuma influência sobre o crescimento micelial do patógeno, todos os isolados de *Trichoderma* demonstraram resultados satisfatórios.

Em relação ao isolado P1, a sua influência não deve ser interpretada como ausência ou falha na produção de metabólitos não voláteis. Testes posteriores devem ser feitos, visando avaliar sua formação de antibiose permitindo seu contato com o papel celofane junto ao meio por períodos de tempo maiores de 48 horas, considerando a técnica de Dennis e Webster (1971a).

A temperatura exerceu forte influência sobre os tratamentos (figura 3). À exceção do isolado P1 todos os isolados de *Trichoderma* tiveram desempenhos bons e ótimos nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, com a exceção do isolado T26 que não se mostrou eficiente à temperatura de 20°C. Houveram casos de 100% de inibição do crescimento do isolado S1 do patógeno, como os tratamentos com o isolado TR2 nas temperaturas de 20, 25 e 30°C.

Estes dados estão de acordo com outros encontrados na literatura consultada. No trabalho de (1991), *Trichoderma koningii* germinou e infectou escleródios em temperaturas variando de 7 a 35°C, sendo a temperatura ótima para germinação de conídios entre 15 e 30°C, e para a infecção de escleródios entre 20 e 30°C.

O efeito dos metabólicos produzidos pelos isolados de *Trichoderma* parecem ser somente fungistáticos, de acordo com (Dennis e Webster, 1971a), que não observaram alterações de características morfológicas de colônias de *Sclerotinia sclerotiorum*, no que se refere a adensamento, compactação, coloração, quando observadas ao microscópio.

Apesar de não ter havido diferença estatística para os diferentes pH's, houve diferenças significativas para a interação entre isolados e pH (quadro 3).

Outros trabalhos estabelecem correlações entre variações na temperatura e eficiência dos antagonistas. Em temperaturas abaixo de 20°C, a taxa de infecção de escleródios no campo cai drasticamente. Fato semelhante foi constatado neste trabalho, os metabólitos não voláteis dos antagonistas praticamente não inibiram o isolado S1 de *S. sclerotiorum*, quando testados nas temperaturas de 10 e 15°C. Em se tratando de incidências do mofó branco do feijoeiro, considerando a faixa de amplitude térmica ótima de 15a 21°C ao desenvolvimento do patógeno (Vieira, 1988), não haveria eficiência por parte dos antagonistas aqui testados sob estas condições.

À exceção da interação entre o efeito do isolado TR2 e os diversos pH's, todas as outras interações para os isolados de *Trichoderma* foram altamente significativas, demonstrando que o pH do meio pode influir na quantidade de metabólitos nos resultados do experimento. Observou-se a tendência de haver maior inibição do isolado S1 pelos metabólicos do isolado T10 no pH mais ácido, e o inverso foi observado para os isolados T26 e T15. Em relação ao tratamento com o isolado P1, o pH do meio também pôde influir significativamente nos resultados obtidos, porem, sem promover inibição do patógeno.

Em condições de campo *Trichoderma* sp. se desenvolve melhor em ambiente ácido, conforme Dennis e Webster (1971a, c) observaram em seus trabalhos. Houve pouca influência em relação ao pH para *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma pseudokoningii*. Para *Trichoderma koningii*, houve maior sucesso em inibições a 4,0 do que a pH 6,5 ao contrário de *Trichoderma viride*.

Os isolados de *Trichoderma* utilizados neste experimento são os mesmos utilizados por Michereff et al (1993), que no seu experimento ainda testou um isolado de *T. harzianun* para controle de *Colletotrichum graminicola*. É interessante que trabalhos posteriores continuem o estudo do espectro de ação ou especificidade destes isolados. De modo geral espécies de *Trichoderma*, *Penicillium* e *Gliocadium* são conhecidas como produtoras de antibióticos de largo espectro de ação. Porém, a maioria dos isolados de *Trichoderma* sp. e *Gliocadium* sp. utilizados por Dennis e Wesbster (1971 b) não tiveram efeito significativo na inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*, que assim como *S. sclerotiorum* é conhecido como um patógeno inespecífico e distribuído mundialmente.

Assim como nenhum antagonista é responsável pelo controle natural de um patógeno, o mesmo pode-se esperar de seus mecanismos de ação. Produtos antibióticos

juntamente com enzimas celulolíticas podem auxiliar a penetração através da parede celular do hospedeiro. Há possíveis variações da metodologia empregada neste teste, como a apresentada por Martins (1988), que empregou discos de papel celofane de 9 cm de diâmetro ao invés de folhas de 12 x 12 cm utilizadas neste experimento. A utilização de discos tem a grande vantagem de facilitar a colocação do celofane sobre o meio, evitando também a formação de espaços em que o celofane não toca o meio. Como desvantagem, a utilização do celofane na forma de discos aumenta a possibilidade de possíveis contaminações, como foi demonstrado em experimentos prévios, principalmente em se tratando da inoculação de *Penicillium* sp. P1, que esporula abundantemente quando cultivado em BDA.

O modelo de teste apresentado proporciona uma boa visão da produção de antibióticos, servindo como alternativa válida ao teste que utiliza culturas pareadas, sendo válido inclusive como modelo didático.

Não se pode omitir a interação tripla altamente significativa que houve entre isolados, temperaturas, e pH's, ou seja, cada fator isoladamente exerceu influência sobre a interação dos outros. Matematicamente falando já é extremamente difícil a interpretação deste tipo de interação, e uma explicação biológica para estes resultados parece ser bastante abstrata. Pode-se pelo menos afirmar que cada um dos fatores testados (isolados, temperatura e pH's) influíram de forma altamente significativa na interação que ocorreu entre quaisquer dos dois outros fatores.

## 4.2 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

O experimento foi analisado com o auxílio do teste Tukey, com nível máximo de significância igual a 5%. Os dados observados foram transformados segundo  $\sqrt{X+1}$ .

Todos os isolados foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno demonstrando a produção de metabólitos voláteis. Não houve diferença entre a inibição de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* promovida pelos diferentes isolados, sob o ponto de vista estatístico (Quadro 4), assim como também não houve diferença na produção de metabólitos não voláteis prejudiciais ao isolado S1.

A variação na temperatura foi um fator altamente significativo, o que demonstra a necessidade de inclusão deste fator em testes para seleção de antagonistas. Caso contrário, corre-se o risco de se ter resultados adulterados e avaliações errôneas. Citando o caso específico do mofó branco do feijoeiro, a faixa ótima de temperatura para o fungo causador está entre 15,5 e 21°C. Pelos dados apresentados no quadro 5 observa-se uma sensível queda na inibição do patógeno a 10°C, onde o patógeno também é atuante.

Sabendo-se que a temperatura ótima para produção de antibióticos pelos isolados utilizados por Martins (1988) para inibição de *V. Dahlie* foi de 28°C, e neste trabalho em relação à inibição de *S. sclerotiorum* ocorreu nas duas temperaturas mais altas, considerar.

Considerar isolados como eficientes contra *S. sclerotiorum* levando em conta sua eficiência a 20 ou 30°C um equívoco, visto que os melhores resultados de inibição do crescimento micelial ocorrem fora das temperaturas em que o perigo de epifítias é maior. Uma opção para se obter isolados de antagonistas capazes de ter seu desempenho ótimo em

temperaturas próximas da ideal para *S. sclerotiorum* é se coletar antagonistas para seleção em regiões que também são propícias à ocorrência do agente fitopatogênico, como fez Illipronti Jr (1991). Também altamente significativa foi a interação entre o fator “isolados” e o fator “temperaturas”, o que realça o que foi afirmado acima. Também não houve interação significativa em relação aos diferentes pH's, mesmo considerando a relativa distância entre os seus valores (5,0 e 7,0).

Os resultados estão de acordo com Martins (1988), que também observou diferenças na produção de metabólitos de *Trichoderma* spp. em diferentes pH's apesar de ser favorecida a pH 4,5. Poderia até se tentar o teste utilizando um pH mais baixo ainda, como 4,0 ou 4,5; porém, quanto mais ácido o meio menos sólido ele fica, observando que o ágar vai perdendo sua propriedade de solidificar o meio.

Outras interações como “isoladas” x “pH” e a interação tripla “isolados” x “temperatura” x “pH” não tiveram diferenças significativas ao nível de 5% utilizado neste teste, apesar de se observar uma tendência ao fato.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* 1- Production of non volatile metabolites. Transactions of the British Mycological Society, London, v.57, n.1, p.25 -39, 1971.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* 2- Production of volatile metabolites. Transactions of the British Mycological Society, London, v.57, n.1, p.41-48, 1971.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 3- Hiphal Interaction. Transactions of the British Mycological Society London, v.57, n.1, p.363-369 , 1971.
- ILLIPRONTI JR., R. A. Efeitos antagônicos de fungos procedentes da região do Alto-Paranaíba - MG, em relação a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary, em soja (*Glycine max* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: ESAL, 1991. 70p. (Dissertação, Mestrado em Agronomia-Fitossanidade).
- MARTINS, M. P. Potencial antagônico de espécies de *Trichoderma* contra *Verticillium dahlie* em berinjela (*Solanum melongena* L.). Piracicaba, ESALQ-USP, 1988. 156p. Dissertação, Mestrado em Microbiologia Agrícola.

MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. Summa Phytopatologia, Piracicaba, v.19, n.1, p.14-17, 1993.

VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa, UFV, 213p., 1988.



## CONCLUSÃO GERAL

Quando é feita a seleção "in vitro" de microrganismos para controle biológico de doenças em plantas diversos fatores devem ser considerados, para que os resultados obtidos reflitam com maior precisão a eficiência ou não de um antagonista.

Deve-se considerar o método de avaliação, levando-se em conta aquele que permite a melhor expressão da capacidade do antagonista em inibir o patógeno em questão. As metodologias apresentadas para avaliação de antagonistas de acordo com sua produção de metabólitos voláteis e não voláteis permitem boa visualização da formação de antibiose pelos isolados testados.

Dentre os fatores testados, a variação de temperaturas mostrou-se bastante importante no sentido de mostrar que um antagonista promissor numa dada temperatura pode ter sua eficiência comprometida em outra. É sempre interessante que se teste o antagonismo em temperaturas favoráveis ao patógeno. Um modo de evitar perdas na eficiência de antagonistas em condições desfavoráveis como a baixas temperaturas é o melhoramento genético destes antagonistas, através de mutações ou hibridações com microrganismos adaptados a estas condições adversas.

A utilização de diversos pH's não mostrou mudanças drásticas na eficiência dos antagonistas testados, e sua utilização pode ser desconsiderada a fim de facilitar a montagem de experimentos "in vitro" para verificação de antibiose por antagonistas.

Dado o insucesso do tratamento de sementes somente com os metabólitos dos antagonistas, pode-se tentar a imersão das sementes por maior período de tempo, ou a purificação de antibióticos dos antagonistas para posterior tratamento das sementes ou ainda

purificação de antibióticos dos antagonistas para posterior tratamento das sementes ou ainda o tratamento de sementes com suspensão de esporos dos antagonistas, como é feito tradicionalmente.

No campo, o controle biológico com antagonistas tem sido difícil ou inadequado. Muito mais pesquisas são necessárias com antagonistas, especialmente em meios de propagação e especificidade de isolados, antes do controle biológico se tornar um componente efetivo do controle integrado de doenças de plantas.

A atividade antibiótica de muitos antagonistas pode representar um grande impedimento à sua aplicação prática desde que qualquer restrição ao uso de antibióticos na agricultura poderia se estender ao uso de seus produtores. É essencial que se estude a possibilidade do agente de biocontrole ser em algum momento tóxico, patogênico ou prejudicial em relação aos seres humanos e à cultura a ser protegida. Também deve ser dada atenção ao estudo a respeito a problemas de patenteamento, com o objetivo de proporcionar às preparações microbiológicas uma forte posição legal.

De acordo com a literatura há grande variação dentro da maioria dos grupos espécies de *Trichoderma* com respeito à produção de substâncias inibitórias difusíveis por sua diversidade de espécies e isolados; o mesmo pode se esperar de outras espécies de fungos. Deste modo, realça-se a importância de estudos regionais para controle biológico de fitopatógenos.

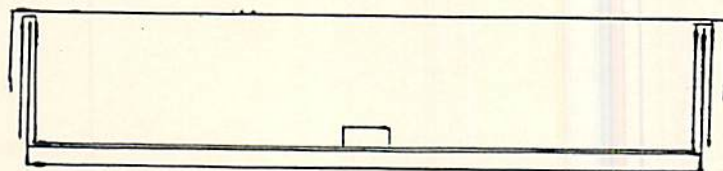


Figura 1: Vista lateral de placa de petri preparada para o teste de verificação de produção de compostos não voláteis.

Quadro 1: Análise de variância do experimento de produção de compostos não voláteis

| Causas da variação       | G.L. | Q.M     | Prob. > F |
|--------------------------|------|---------|-----------|
| Isolados                 | 4    | 7,33**  | 0,00001   |
| Temperatura              | 4    | 18,39** | 0,00001   |
| pH                       | 2    | 0,02    | 0,21539   |
| Isolados x temperatura   | 16   | 1,50**  | 0,00001   |
| Isolados x pH            | 8    | 0,25**  | 0,00001   |
| Isol. x temperatura x pH | 32   | 0,11**  | 0,00001   |
| Resíduo                  | 224  | 0,01    |           |

Coefficiente de variação = 7,51%

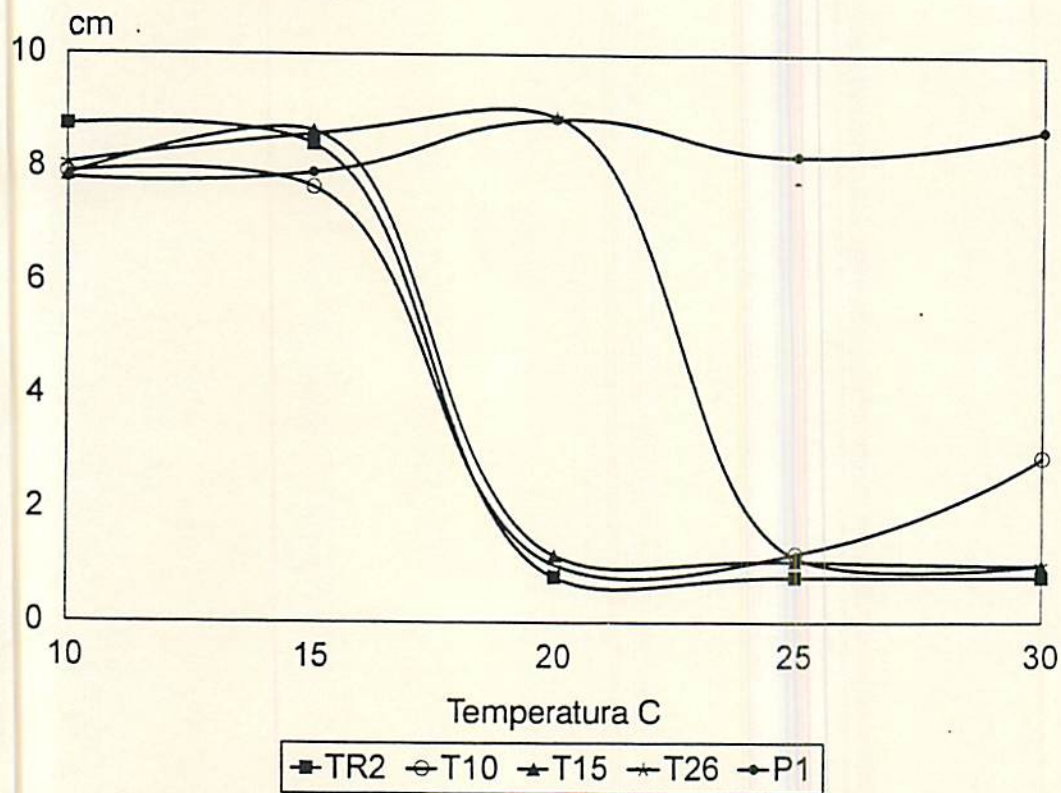


Figura 2: Diâmetro (médias não transformadas) de colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* cinco dias após contato com compostos não voláteis dos antagonistas *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* e *T. pseudokoningii* T26 e *Penicillium* sp. P1.

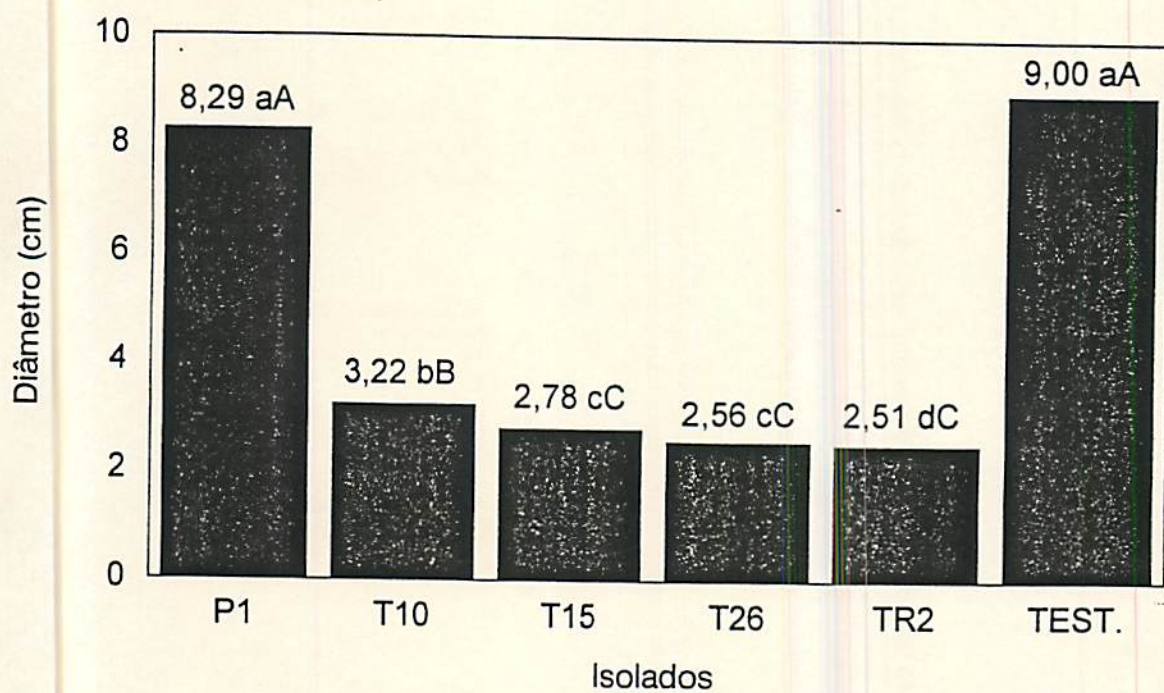


Figura 3: Diâmetro de colônias de *S. sclerotiorum* após 5 dias de crescimento em meio com compostos não voláteis dos antagonistas, considerando a interação entre isolados e temperaturas. Os antagonistas utilizados foram *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* e *T. pseudokoningii* T26 e *Penicillium* sp. P1.

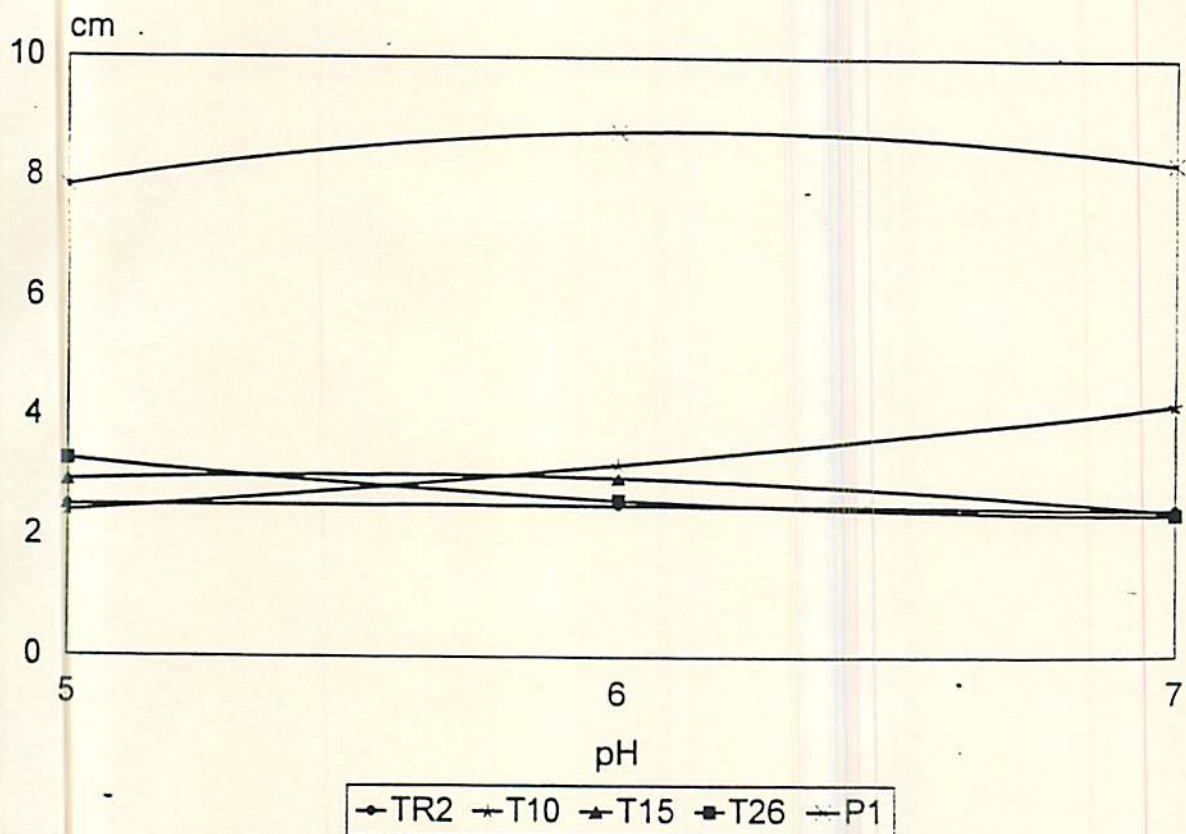


Figura 4: Diâmetro de colônias de *S. sclerotiorum* considerando a interação entre isolados e pH, no teste de produção de compostos não voláteis, pelos antagonistas *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. koningii* e *T. pseudokoningii* T26 e *Penicillium* sp. P1.

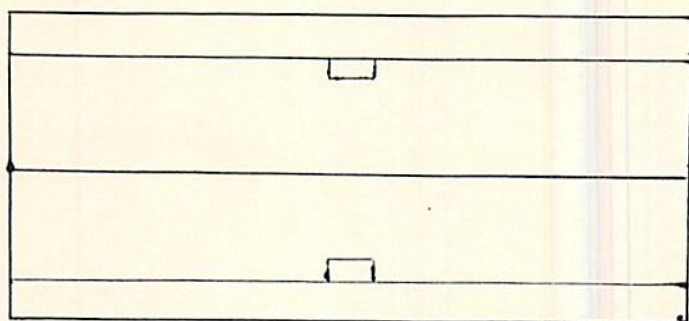


Figura 5: Vista lateral de placa de petri preparada para teste para a produção de compostos voláteis (Mariano, 1993).



Quadro 2: Análise de variância do experimento de produção de compostos voláteis.

| Causas da variação       | G.L. | Q.M.   | Prob. > F |
|--------------------------|------|--------|-----------|
| Isolados                 | 4    | 0,04   | 0,91      |
| Temperatura              | 2    | 5,51** | 0,00001   |
| pH                       | 1    | 0,60   | 0,064     |
| Isolados x temperatura   | 8    | 1,03** | 0,0005    |
| Isolados x pH            | 4    | 0,21   | 0,30      |
| Isol. x temperatura x pH | 8    | 0,34   | 0,06      |
| Resíduo                  | 62   | 0,17   |           |

Coefficiente de variação = 18,07%

Quadro3: Diferenças entre médias de diâmetro de colônias de *S. sclerotiorum* considerando a interação entre isolados e temperaturas do experimento de produção de compostos voláteis dos antagonistas *Trichoderma viride* TR2, *T. aureoviride* T10, *T. Koningii* e *T. pseudokoningii* T26 e *Penicillium* sp. P1.

|      | TR2   | T10    | T15    | T26   | P1    |
|------|-------|--------|--------|-------|-------|
| 10°C | 3,59a | 3,05ab | 2,70ab | 0,8b  | 0,8b  |
| 20°C | 3,81b | 3,38b  | 6,22ab | 8,34a | 7,44a |
| 30°C | 3,81a | 5,35a  | 4,25a  | 3,84a | 5,20a |
|      | 3,74a | 3,88a  | 4,30a  | 3,84a | 4,04a |