



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO COM *Trichoderma***

**DANIEL DIEGO COSTA CARVALHO**

**Brasília-DF**

**2011**

**DANIEL DIEGO COSTA CARVALHO**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO COM *Trichoderma***

Tese apresentada à Universidade de Brasília como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Doutor.

**Brasília-DF**

**2011**

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação da **Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Arroz e Feijão.

**“Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e promoção de crescimento do feijoeiro com *Trichoderma*”**

**Daniel Diego Costa Carvalho**

Tese aprovada em 24/08/2011 por:

Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello  
Orientadora/Presidente

Prof. Adalberto Corrêa Café Filho  
Examinador

Prof. Luiz Eduardo Bassay Blum  
Examinador

Dr. Wagner Bettiol  
Examinador

Dr. Marcos Rodrigues de Faria  
Examinador

Eu dedico esta tese  
a quatro pessoas na minha vida:  
Helena, minha mãe;  
Coriolano, meu pai;  
Samara, minha irmã;  
e Rafael, meu irmão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, principal responsável por esta tese de doutorado.

Aos meus pais e meus irmãos, por estarem comigo sempre.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Departamento de Fitopatologia, por me acolherem num momento de intenso crescimento profissional, oferecendo a oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e à Embrapa Arroz e Feijão, onde foram realizados os experimentos.

À FAP-DF, pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa.

À Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), pela orientação e amizade durante o doutorado.

Ao Dr. Murillo Lobo Junior (Embrapa Arroz e Feijão), por ter me acolhido, aceitando ajudar na execução dos experimentos de campo, sempre disposto em ajudar, nunca negou uma ajuda.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, por muito contribuírem para a minha formação intelectual e pessoal. Agradeço aos ensinamentos nas disciplinas e às valiosas orientações profissionais dadas a mim pelos professores Adalberto C. Café Filho, Carlos H. Uesugi, Cláudio L. Costa, José C. Dianese, Juvenil E. Cares, Luiz Eduardo B. Blum, Helson M.M. do Vale e Marisa A.S.V. Ferreira.

Ao Dr. Peter W. Inglis (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), pela atenção dispensada durante o exame de qualificação.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Magno, Leo, Irene, Deborah e Mayara, pela ajuda na primeira metade experimental da tese.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Arroz e Feijão: Alaerson (Peixe), Elder (Stanley), Márcio, Lívia, Anaíres e Ronair, pela ajuda na segunda metade da tese.

Ao Ribamar (UnB), pela amizade e ajuda.

Ao amigo Thiago Alves Santos de Oliveira.

Aos amigos e colegas que fiz durante o curso de doutorado: Ana Paula, Ednalva, Pablo, Maria, Magno, Leo, Camila e Eugênio.

Ao Leonício e toda sua família.

## ÍNDICE GERAL

	PÁGINA
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
<b>CAPÍTULO 1 – Biocontrole de patógenos em sementes e promoção do crescimento de plântulas de feijão comum por <i>Trichoderma harzianum</i>.....</b>	<b>01</b>
RESUMO.....	02
ABSTRACT.....	03
INTRODUÇÃO.....	04
MATERIAL E MÉTODOS.....	06
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
REFERÊNCIAS.....	16
<b>CAPÍTULO 2 – Antagonismo <i>in vitro</i> e aplicação foliar de <i>Trichoderma harzianum</i> para controle do mofo branco do feijão comum.....</b>	<b>21</b>
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	38
<b>CAPÍTULO 3 – Controle biológico da murcha de fusário do feijoeiro comum com <i>Trichoderma harzianum</i>.....</b>	<b>42</b>
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	67

<b>CAPÍTULO 4 – Controle de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por <i>Trichoderma harzianum</i>.....</b>	<b>71</b>
RESUMO.....	72
ABSTRACT.....	73
INTRODUÇÃO.....	74
MATERIAL E MÉTODOS.....	75
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87

## RESUMO GERAL

CARVALHO, Daniel Diego Costa. **Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e promoção de crescimento do feijoeiro com *Trichoderma***. 2011. 89p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Trichoderma harzianum* para supressão de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijão comum, promoção do crescimento inicial de plantas, rizocompetência e biocontrole do mofo branco e da murcha de fusário do feijoeiro, em condições de campo. A partir de 40 isolados pertencentes à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, selecionaram-se cinco isolados (CEN287, CEN 288, CEN289, CEN290 e CEN316), com bases em ensaios de cultura pareada e verificação de hiperparasitismo, para serem testados quanto aos itens apresentados. Para avaliar a capacidade de suprimir os patógenos em sementes, empregaram-se as cultivares ‘Jalo Precoce’ e ‘BRS Valente’ contaminadas por *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum*, respectivamente, as quais foram microbiolizadas com os antagonistas. Para promoção de crescimento, os isolados foram avaliados em casa de vegetação (cv) e campo, com a rizocompetência avaliada em cv, mediante coleta de raízes. Para controle do mofo branco em campo, os antagonistas foram aplicados ( $2,4 \times 10^{12}$  conídios  $ha^{-1}$ ) aos 42 e 52 DAS de feijão Pérola, em dois ensaios (2009 e 2010), com avaliações de severidade aos 72 DAS. Para a murcha de fusário, os isolados foram aplicados nos sulcos de plantio ( $1,2 \times 10^{12}$  conídios  $ha^{-1}$ ), semeando-se a cultivar ‘BRS Valente’ (safras 2009/2010 e 2010). Aos 64 DAS, avaliou-se a severidade da murcha de fusário. Os isolados CEN287 e CEN316 foram efetivos na supressão de *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* em sementes (redução de 90 e 92%; e 40 e 31% de incidência, respectivamente). CEN289 e CEN290 se destacaram quanto à promoção do crescimento do feijoeiro em cv, com resultados reproduzidos em campo. CEN290 foi o melhor isolado nos testes de rizocompetência, colonizando 80-90% dos fragmentos das raízes coletadas. Nos testes em campo, CEN287, CEN316 foram os isolados que proporcionaram a maior redução da severidade do mofo branco nas duas safras (6,7 e 2,3%; 7,5 e 11,7%, respectivamente), comparativamente à testemunha (28,5 e 58,7%). Não houve diferença significativa para produtividade, cujos valores médios variaram entre 1820 e 2162 (2009) e 2285 e 3471



(2010) kg ha<sup>-1</sup>. Com relação ao controle da murcha de fusário, CEN287 e CEN316 apresentaram índices de murcha (24,3% e 21,0%, respectivamente) e inferiores à testemunha (40,4%) na safra 2010. Não houve diferença significativa para produtividade, cujos valores variaram entre 2878 e 3664 (safra 2009/2010) e 3336 e 3948 (safra 2010) kg ha<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*, patologia de sementes, patógeno habitante do solo, murcha vascular, supressão de crescimento.

## GENERAL ABSTRACT

CARVALHO, Daniel Diego Costa. **Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* and common bean growth promotion by *Trichoderma***. 2011. 89p. (Thesis – Doctor Degree in Plant Pathology) – University of Brasília, Brasília, DF.

The objective of this study was to select isolates of *Trichoderma harzianum* for suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in common bean seeds, initial growth-promoting activity, rhizosphere competence and biocontrol of white mold and *Fusarium* wilt in common bean, under field conditions. As from 40 isolates belonging to the Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, five *T. harzianum* isolates were selected (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 and CEN316) based on hyperparasitism and dual culture assays, aiming to evaluate this isolates as the presented goals. Aiming to evaluate the ability to suppress pathogens in seeds, were used Jalo Precoce and BRS Valente cultivars contaminated with *S. sclerotiorum* and *F. oxysporum*, respectively, which were treated with the antagonists. For plant growth promotion, the isolates were evaluated in greenhouse and field conditions, with rhizosphere competence evaluated in greenhouse, using collected roots. Concerning the effect of the isolates in controlling white mold under field conditions, antagonists were applied ( $2.4 \times 10^{12}$  conidia  $\text{ha}^{-1}$ ) at 42 and 52 DAS on ‘Perola’ cultivar, in trials conducted in 2009 and 2010, with evaluations of severity (72 DAS). In field testes with *Fusarium* wilt, isolates were sprayed in the furrows ( $1.2 \times 10^{12}$  conidia  $\text{ha}^{-1}$ ), using ‘BRS Valente’ cultivar (2009/2010 and 2010). At 64 DAS, *Fusarium* wilt severity was evaluated. CEN287 and CEN316 isolates were effective in suppressing *S. sclerotiorum* and *F. oxysporum* on seeds (reduction of 90 and 92%, and 40 and 31% of incidence, respectively). CEN289 and CEN290 stood out for promoting the growth of common bean plants in the greenhouse experiments, with results confirmed in the field. CEN290 was the best isolate in the rhizosphere competence assays, colonizing 80-90% of collected root fragments. In field assays, CEN287 and CEN316 were the isolates that provided the greatest reduction of the white mold severity in the two harvests (6.7 and 2.3%; 7.5 and 11.7%, respectively), compared to control (28.5 and 58.7%). No significant difference was verified for yield, which ranged from 1820 to 2162  $\text{kg ha}^{-1}$  and from 2285 to 3471  $\text{kg ha}^{-1}$ , for 2009 and 2010 seasons, respectively. Regarding

the control of *Fusarium* wilt, CEN287 and CEN316 presented wilt indexes (24.3% and 21.0%, respectively) and lower in comparison to the control (40.4%) in 2010 season. There were no significant differences in yield, with values ranging between 2,878 to 3,664 kg ha<sup>-1</sup> (harvest 2009/2010) and 3,336 to 3,948 (harvest 2010) kg ha<sup>-1</sup>.

**Key-words:** *Phaseolus vulgaris*, seeds pathology, soilborne pathogen, vascular wilt, growth suppression.

## **CAPÍTULO 1**

**Biocontrole de patógenos em sementes e promoção do crescimento de plântulas de  
feijão comum por *Trichoderma harzianum***

**(Versão modificada para submissão ao periódico *Pesquisa Agropecuária Brasileira*)**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Trichoderma harzianum* para: 1) biocontrole de patógenos veiculados por sementes de feijoeiro comum, 2) promoção do crescimento de plantas e 3) rizocompetência. Foram avaliados cinco isolados do fungo, em comparação com um isolado comercial de *T. harzianum*, Carboxin+Thiram (300 mL 100 kg<sup>-1</sup> sementes) e testemunha não inoculada. Sementes de feijão 'Jalo Precoce' foram microbiolizadas (2 mL 100 g<sup>-1</sup> sementes de suspensões dos antagonistas a 2,5 x 10<sup>8</sup> conídios viáveis mL<sup>-1</sup>). Em seguida, foram realizados testes de germinação e de sanidade de sementes com relação aos fungos causadores de deterioração (*Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp.) e do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Para avaliar a promoção de crescimento, os isolados foram aplicados em substrato autoclavado em casa de vegetação e em campo, utilizando-se 40 mL metro linear<sup>-1</sup> no sulco de plantio com 5 x 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup> em parcelas de 4 m<sup>2</sup>. Aos oito dias após o semeio (DAS) estimou-se o percentual de emergência. Para os testes de rizocompetência, 100 mL de suspensão dos isolados (5 x 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup>) foram pulverizados sobre caixas de 30 x 40 cm contendo areia lavada autoclavada, seguida por avaliação da colonização de raízes aos 10 DAS em cinco plantas/caixa. CEN287 e CEN289 foram os isolados mais eficientes no controle de *Aspergillus* spp., reduzindo sua incidência nas sementes em 56 e 61%, respectivamente. O melhor controle de *Cladosporium* spp. (67% de redução de incidência), foi obtido com o isolado comercial. CEN287 e CEN316 foram os mais efetivos no controle de *S. sclerotiorum* (redução de incidência em 90 e 92%, respectivamente). O fungicida Carboxin+Thiram reduziu em 98% a incidência de *S. sclerotiorum* e controlou totalmente os demais patógenos. Os isolados CEN289 e CEN290 se destacaram quanto à promoção do crescimento do feijoeiro em casa de vegetação, com resultados reproduzidos em campo. CEN290 foi o melhor isolado nos testes de rizocompetência, colonizando 80-90% dos fragmentos das raízes coletadas.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*, patologia de sementes, controle biológico.

## ABSTRACT

The objective of this work was to select isolates of *Trichoderma harzianum* for: 1) biocontrol of common bean seed-borne pathogens, 2) plant growth promotion and 3) rhizosphere competence. Five strains of *T. harzianum* were evaluated, in comparison with a commercial isolate of *T. harzianum*, Carboxin+Thiram (300 mL 100 kg<sup>-1</sup> seeds) and control. Common bean seeds 'Jalo Precoce' were treated (2 mL 100 g<sup>-1</sup> seeds of suspensions of antagonists at 2.5 x 10<sup>8</sup> conidia mL<sup>-1</sup>). Just after, seeds healthy and germination assays were carried out for deteriorated fungi (*Aspergillus* spp. and *Cladosporium* spp.) and white mold agent (*Sclerotinia sclerotiorum*). To evaluate growth promotion, the isolates were applied on autoclavated substrate in greenhouse experiment and also under field conditions, using 40 mL linear meter<sup>-1</sup> of suspension at 5 x 10<sup>7</sup> conidia mL<sup>-1</sup> into furrows from repetitions of 4 m<sup>2</sup>. At the 8 days after sowing (DAS), percentage of emergence was estimated. For the rhizosphere competence assays, 100 mL of suspension (5 x 10<sup>7</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) were applied on plastic box (30 x 40 cm) containing autoclavated washed sand, followed by evaluation of root colonization at the 10 DAS using five plants plastic box<sup>-1</sup>. Strains CEN287 and CEN289 were the best isolates in the control of *Aspergillus* spp., reducing its seeds incidence in 56 and 61%, respectively. The best control of *Cladosporium* spp. (67%), was obtained by commercial isolate. Strains CEN287 and CEN316 were the most effective in the control of *S. sclerotiorum* (reduction of 90 and 92%, respectively). Carboxin+Thiram reduced in 98% the incidence of *S. sclerotiorum* and showed total control for the others pathogens. The strains CEN289 and CEN290 were able to growth promote common bean in greenhouse, with results reproduced in field conditions. Strain CEN290 was the best isolate in the rhizosphere competence assays, colonizing 80-90% of collected root fragments.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, seeds pathology, biological control.

## INTRODUÇÃO

O ataque de patógenos a sementes de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) provoca perda da qualidade fisiológica das sementes, desuniformidades na germinação e no estande inicial (Paula Júnior *et al.*, 2008). Além disso, as sementes constituem-se em importantes veículos de disseminação e introdução de patógenos ou raças de patógenos em regiões indenadas (Ito *et al.*, 2003; Corrêa *et al.*, 2008).

Dentre os patógenos associados às sementes, os fungos são considerados os mais importantes, não somente devido ao maior número de espécies, mas também pelos prejuízos causados (Mertz *et al.*, 2009). Na cultura do feijoeiro comum, existem diversos patógenos de importância epidemiológica que causam prejuízos à qualidade das sementes, dentre os quais, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Este pode sobreviver em sementes por mais de três anos e, através delas, estabelecer a doença em novas áreas no início do ciclo da cultura (Tu, 1988), quando infecta as plântulas, danificando o hipocótilo (Brasil, 2009). Em solo infestado, este patógeno causa o mofo branco, que é uma das doenças mais destrutivas do feijoeiro comum, capaz de causar 100% de perdas na produção (Lobo Júnior *et al.*, 2009).

Os gêneros *Aspergillus* spp. Micheli & Link e *Cladosporium* spp. Link, por sua vez, são comuns em sementes de feijão durante o armazenamento e podem causar prejuízos na germinação e no vigor, quando as sementes não são tratadas (Ito *et al.*, 2003; Zucchi & Melo, 2009). Para exemplificar a importância destes gêneros, Krishnamuthry & Shashikala (2006) relataram efeitos negativos decorrentes da colonização de sementes de soja por *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. Em adição ao potencial desse fungo para a produção de aflatoxinas, esta espécie revelou ser capaz de inibir a germinação das sementes, crescimento das plântulas, alongação radicular e a síntese de clorofila, de carotenóides e de proteínas. Já *Cladosporium* spp. pode causar manchas no tegumento, resultando em um aspecto indesejável e consequente depreciação dos lotes de sementes (Marino & Mesquita, 2009).

O uso de sementes tratadas com fungicidas sintéticos e agentes de biocontrole ocasiona redução da disseminação de patógenos para áreas indenadas e reduz a transmissão de doenças no campo, contribuindo para uma maior densidade de plantas (Sartori *et al.*, 2004). Seu efeito de erradicação de patógenos e de proteção contra doenças nas fases de pré e pós-emergência possibilita economia no estabelecimento da lavoura. De acordo com Ito *et al.* (2003), o tratamento de sementes, por requerer pouco volume do produto, representa apenas 0,1% a 0,5% do custo total da produção.

Os fungicidas sintéticos aplicados às sementes propiciam a obtenção das fibras e alimentos necessários à população mundial, porém, seu efeito é limitado. Mesmo para culturas de alta rentabilidade, o controle biológico de fitopatógenos pode apresentar uma série de vantagens em relação ao uso de fungicidas químicos (Pomella & Ribeiro, 2009). Além disso, os fungicidas químicos não podem ser usados em sistemas de cultivo orgânico, existindo assim, uma forte demanda por soluções alternativas, como o uso de bioprotetores. Pomella & Ribeiro (2009) preconizam o uso contínuo do *Trichoderma* para redução do número de aplicações de fungicidas químicos e até mesmo a eliminação dessa prática, dependendo das condições ambientais, severidade da doença na área e de outras técnicas de manejo empregadas. Ainda, de acordo com esses autores, o tratamento de sementes de grandes culturas com fungicida pode ser totalmente substituído pelo tratamento biológico, trazendo entre outras vantagens, benefícios sócio-ambientais.

Além dos efeitos de *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos, certos isolados podem estimular o desenvolvimento de plantas (Harman *et al.*, 2004). A habilidade de *T. harzianum* T-22 e *T. atroviride* P1 em promover o crescimento de plantas de alface, tomate e pimentão foi confirmada por Vinale *et al.* (2008). Tais efeitos no desenvolvimento das culturas são decorrentes da colonização rizosférica (rizocompetência) e produção de substâncias estimuladoras do crescimento vegetal (Mathivanan *et al.*, 2005), bem como da solubilização de nutrientes presentes nas proximidades das raízes, tornando-os prontos para serem assimilados (Harman, 2000). Os benefícios às plantas proporcionados pela colonização rizosférica por fungos do gênero *Trichoderma* fazem da rizocompetência uma das propriedades buscadas durante a seleção de potenciais agentes de controle biológico de doenças (Harman *et al.*, 2004).

Existem vários produtos à base de *Trichoderma* no mercado, recomendados tanto para o tratamento de substratos como para o tratamento de sementes (Resende *et al.*, 2004; Ethur *et al.*, 2007). Entretanto, as informações geradas pela pesquisa em tratamento de sementes com fungicidas biológicos ainda são escassas (Mertz *et al.*, 2009).

Estudos conduzidos com isolados de *Trichoderma* mantidos em coleção de cultura, levaram à seleção de cinco isolados de *T. harzianum* como promissores para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Oliveira *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2008). Com base nesses resultados, foi conduzido este trabalho com os objetivos de avaliar o efeito desses isolados como agentes de biocontrole de patógenos



veiculados e prejudiciais à germinação e ao vigor das sementes; como promotores do crescimento de plantas de feijoeiro comum e quanto à rizocompetência.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolados de *Trichoderma harzianum***

Os cinco isolados (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) empregados neste trabalho pertencem a Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), e foram identificados como *T. harzianum*, em conformidade com Samuels *et al.* (2009). Os testes descritos a seguir, em laboratório, casa de vegetação e condições de campo, foram conduzidos na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO.

### **Multiplicação de *Trichoderma harzianum***

Discos de ágar (5 mm de diâmetro), retirados de culturas dos isolados aos sete dias de cultivo, foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade (6 discos/frasco), contendo arroz parboilizado (15 g/frasco), previamente umedecido (60% p v<sup>-1</sup>) e autoclavado (121° C; 40 min). Os frascos foram mantidos em incubadora BOD a 25° C e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias de incubação, adicionou-se água destilada esterilizada aos frascos para, em seguida, recolher os esporos, que foram filtrados em gaze esterilizada. As concentrações empregadas para tratamento de sementes foram ajustadas em câmara de Neubauer para 2,5 x 10<sup>8</sup> conídios viáveis mL<sup>-1</sup>.

### **Teste para detecção de *Aspergillus* e *Cladosporium* em sementes tratadas com *Trichoderma harzianum***

A análise sanitária das sementes foi realizada pelo método *blotter test* (Regras para Análise de Sementes, 2009). Tal metodologia consistiu em utilizar caixas acrílicas transparentes (gerbox – 11 x 11 cm) desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, contendo duas folhas de papel de germinação, previamente esterilizadas (160 °C; 20 minutos) e umedecidas com água destilada esterilizada em quantidade igual a 2,5 vezes a massa do papel. As sementes de feijão ‘Jalo Precoce’, naturalmente contaminadas por *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp., foram tratadas com os isolados de *Trichoderma* e o produto Ecotrich<sup>®</sup> SC (isolado comercial de *T. harzianum*, produzido pela Ballagro Agro Tecnologia

Ltda., Atibaia, SP, Brasil), na dosagem de 2 mL de suspensão a  $2,5 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> para cada 100 g de sementes. Em seguida, 25 sementes tratadas foram dispostas em cada caixa gerbox e mantidas a -20° C por 24 h. Após esse período, as amostras foram incubadas em sala de crescimento sob temperatura de 20° C e umidade relativa de 98%, durante sete dias, com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada examinando-se individualmente todas as sementes em microscópio estereoscópio (Zeiss Stemi DV4). Para confirmação de cada gênero fúngico presente nas amostras, foram confeccionadas lâminas microscópicas semi-permanentes, contendo o material biológico, o qual foi analisado em microscópio ótico (Nikon Eclipse 55i). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com oito repetições de 25 sementes por tratamento (Marino & Mesquita, 2009). Sementes tratadas com fungicida Carboxin+-Thiram a 300 mL 100 kg<sup>-1</sup> sementes (200 g L<sup>-1</sup> de carboxina; 200 g L<sup>-1</sup> de Tiram) e sementes não tratadas foram utilizadas como controle.

#### **Infecção de sementes com *Sclerotinia sclerotiorum***

Para obtenção de sementes contaminadas por *S. sclerotiorum* (isolado C-54-01), empregou-se a técnica de restrição hídrica utilizando-se meio BDA + Manitol a -1,0 MPa (Costa *et al.*, 2003). Quatro discos do patógeno por placa foram dispostos de forma equidistante a 5 mm da margem das mesmas e, em seguida, as placas foram vedadas com filme plástico. As colônias foram incubadas em BOD a 25° C com fotoperíodo de 12 horas. Quando as colônias do fungo ocuparam toda a superfície do meio (aproximadamente seis dias), 56 g de sementes de feijão 'Jalo Precoce' desinfestadas foram distribuídas sobre a colônia de *S. sclerotiorum* na placa. Para a desinfestação das sementes, estas foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, seguindo-se duas lavagens de 1 min em água destilada esterilizada e secagem em câmara de fluxo laminar durante 20 min. As placas contendo as sementes foram incubadas por mais cinco dias para a colonização das sementes pelo patógeno.

#### **Teste para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes tratadas com *Trichoderma harzianum***

As sementes artificialmente contaminadas com *S. sclerotiorum* foram tratadas com os isolados de *T. harzianum* e o isolado comercial, conforme descrição acima. Em seguida, 50 sementes foram distribuídas uniformemente sobre duas folhas de papel germtest, umedecidas com água destilada e cobertas com uma terceira folha umedecida e subsequente

enrolamento (Regras para Análise de Sementes, 2009). Os rolos de papel obtidos foram colocados dentro de saco preto (4 rolos do mesmo tratamento/saco) e encaminhados para sala de crescimento a 20° C e umidade relativa de 98%, onde permaneceram pelo período de sete dias (Parisi *et al.*, 2006). Os rolos foram, então, umedecidos com água destilada e mantidos em refrigerador a 8° C por mais 10 dias, mantendo-se a ausência de luz. A avaliação da incidência consistiu na observação de micélio tipicamente branco de *S. sclerotiorum* com formação de escleródios negros, forma esférica, irregulares e com tamanho de 2 a 10 mm ao redor das sementes e plântulas infectadas (Regras para Análise de Sementes, 2009). O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes por tratamento (Gomes *et al.*, 2009).

### **Teste de germinação e vigor**

As sementes tratadas, conforme descrito anteriormente, foram também submetidas ao teste de germinação e vigor, conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes por tratamento (Gomes *et al.*, 2009). As sementes foram incubadas em germinador (De Leo e Cia Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) à temperatura de 25° C por nove dias, quando foram estimadas as porcentagens de plântulas normais, anormais e sementes mortas, segundo as Regras para Análise de Sementes (2009).

### **Promoção de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação**

Cada vaso plástico (500 mL de capacidade), contendo substrato comercial autoclavado Plantmax<sup>®</sup>, recebeu um volume de 25 mL de suspensão de esporos a  $2 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> de *T. harzianum* ( $5 \times 10^9$  conídios 500g<sup>-1</sup> de substrato). Em seguida, cinco sementes de feijão 'Jalo Precoce' pertencentes ao mesmo lote empregado no teste de sanidade de sementes foram semeadas em cada vaso. Cada tratamento foi composto por quatro vasos (5 plantas/vaso). Após 14 dias, procederam-se às avaliações, com base no comprimento de raízes e parte aérea de 12 plantas/tratamento, sendo coletadas 3 plantas de um mesmo vaso. As medidas de comprimento foram tomadas de cada planta, separadamente. Para efeito comparativo, foram incluídos mais dois tratamentos: 1) substrato autoclavado tratado com o isolado comercial de *T. harzianum*, na mesma concentração adotada para os isolados de *T. harzianum* e 2) sementes tratadas com Carboxin+Thiram (300 mL 100 kg<sup>-1</sup> sementes), em substrato autoclavado, sem adição de *Trichoderma*.

Adotou-se, também, um controle, constituído por sementes não tratadas, semeadas no substrato comercial autoclavado.

### **Emergência de sementes e promoção de crescimento do feijoeiro em campo**

O experimento de campo foi conduzido sob pivô central, durante os meses de julho e agosto de 2009. Para a instalação do experimento, uma área correspondente a 288 m<sup>2</sup> (24 x 12 m) foi preparada com aração, abertura dos sulcos e fornecimento de NPK 5-25-15 na dosagem de 400 kg ha<sup>-1</sup>. Em seguida, 40 mL metro/linear de suspensão de *T. harzianum* a 5 x 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup> foram distribuídas nos sulcos com emprego de pulverizador manual (550 mL), totalizando 2 x 10<sup>9</sup> conídios metro/linear. Imediatamente após a pulverização dos sulcos, sementes de feijão ‘Jalo Precoce’, pertencentes ao mesmo lote empregado anteriormente, previamente tratadas com os isolados de *Trichoderma* (2 mL de suspensão a 2,5 x 10<sup>8</sup> conídios mL<sup>-1</sup> para cada 100 g de sementes) foram manualmente semeadas (15 sementes metro/linear). Cada tratamento foi composto por quatro parcelas experimentais de quatro linhas de plantio, espaçadas a cada 0,5 m, com 2,0 m de comprimento (2,0 x 2,0 m) e separadas por 1 m sem plantio de feijão. Obedeceu-se ao delineamento em blocos casualizados. O percentual de emergência foi verificado aos oito dias após a semeadura (DAS), estimando-se o número de plântulas emergidas metro/linear, nas duas linhas centrais de cada parcela. Aos 10 DAS, foram avaliados o comprimento das raízes e da parte aérea utilizando metodologia descrita por Araújo & Teixeira (2008), que consistiu em arrancar quatro plantas/parcela, vizinhas entre si e provenientes do terço médio de uma das duas linhas centrais da parcela, sem danificar as raízes. Para efeito comparativo, foram incluídos dois tratamentos: 1) sulcos e sementes tratadas com o isolado comercial de *T. harzianum*, na mesma concentração adotada para os isolados de *T. harzianum*; e 2) sementes tratadas com Carboxin+Thiram (300 mL 100 kg<sup>-1</sup> sementes) semeadas em sulcos sem aplicação de *Trichoderma*. Como controle, empregou-se sementes não tratadas, semeadas em sulcos sem aplicação de *Trichoderma*.

### **Emergência de sementes em areia e rizocompetência dos isolados de *Trichoderma harzianum***

Sementes de feijão ‘Jalo Precoce’ foram tratadas com os isolados (2 mL de suspensão a 2,5 x 10<sup>8</sup> conídios mL<sup>-1</sup> para cada 100 g de sementes) e semeadas em caixas plásticas (30 x 40 cm), contendo areia lavada autoclavada. O experimento foi disposto em

delineamento inteiramente casualizado, com quatro caixas por tratamento (50 sementes/caixa de areia). Após o semeio, um volume correspondente a 100 mL de suspensão dos isolados de *T. harzianum* a  $5 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> foi pulverizado sobre cada caixa de areia. Aos 10 DAS, foi realizada a avaliação de emergência em areia e coleta de cinco plantas/caixa para avaliação dos isolados quanto à rizocompetência. As raízes das plantas coletadas foram lavadas, excisadas em dois segmentos (da coroa até os próximos 5 cm e dos 5 cm medianos até a extremidade da raiz) com o auxílio de um bisturi estéril. As raízes obtidas de cada segmento foram cortadas em pedaços menores (1 cm). Os fragmentos de cada tratamento foram separadamente acondicionados em placas de Petri de vidro estéreis lacradas, onde permaneceram na ausência de luz em sala de incubação a 22°C durante 48h, para secagem natural das raízes. Os fragmentos de raízes foram transferidos para *Trichoderma selective medium* - TSM (0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,26 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,26 g KNO<sub>3</sub>; 1,0 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 1,0 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 0,05 g ácido cítrico; 1,0 mL Igepal; 2,0 g Sacarose; 18,0 g ágar; 0,0025 g Vinclozolin; 1000 mL água destilada) na quantidade de 10 fragmentos por placa de Petri (90 mm). Para cada isolado, foram preparadas 16 placas (8 placas/segmento de 5 cm), sendo duas placas para cada grupo de cinco plantas de uma mesma caixa. Após cinco dias de incubação em BOD à 25°C, procederam-se as contagens do percentual de fragmentos colonizados por *T. harzianum*. Como controle, empregou-se caixas de areia sem adição de *Trichoderma*. O teste de rizocompetência foi realizado duas vezes.

### **Análises estatísticas**

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância, com suas médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Teste para detecção de *Aspergillus* e *Cladosporium* em sementes tratadas com *Trichoderma harzianum***

Carboxin+Thiram foi o melhor tratamento para controle de *Cladosporium* e *Aspergillus* nas sementes de feijão 'Jalo Precoce' (Tabela 1). O isolado comercial apresentou desempenho significativamente superior aos demais isolados de *Trichoderma* e

reduziu em 67% a incidência de *Cladosporium* spp. nas sementes, seguido pelos isolados de *T. harzianum* CEN287 e CEN316, cuja redução foi de 41 e 40%, respectivamente. Os isolados CEN288, CEN289 e CEN290 também apresentaram diferença significativa em relação às sementes não tratadas. Quanto à incidência de *Aspergillus* spp., todos os isolados de *Trichoderma* diferiram da testemunha. Novamente, o controle químico foi o tratamento mais eficaz, controlando em 100% o patógeno nas sementes (Tabela 1). Os isolados CEN289 e CEN287 se destacaram dos demais, reduzindo em 61 e 56% a incidência de *Aspergillus* spp. nas sementes, respectivamente.

Embora tenha apresentado desempenho inferior ao isolado comercial, o isolado CEN287 reduziu em 41% a incidência de *Cladosporium* spp. De forma análoga, a ação antagonista de *T. harzianum* sobre o patógeno ocorre por meio de hiperparasitismo, com murcha de micélio e esporulação dentro das hifas de *C. herbarum*, como verificado em condições experimentais *in vivo* (Barbosa *et al.*, 2001).

CEN289 e CEN287 reduziram em 61 e 56% a incidência de *Aspergillus* spp. nas sementes, respectivamente, mostrando-se mais eficientes que os outros isolados de *T. harzianum* e o isolado comercial. Embora vários mecanismos possam ocorrer simultaneamente no biocontrole de doenças por *Trichoderma* spp., Agüero *et al.* (2008) indicam a antibiose como principal mecanismo envolvido no controle de *A. flavus* em sementes de milho. A exposição de *A. flavus* aos metabólitos voláteis produzidos por *T. harzianum* foi responsável pela redução de 31,7% da biomassa do patógeno nas sementes (Agüero *et al.*, 2008).

### **Teste para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes tratadas com *Trichoderma harzianum***

Todos os tratamentos biológicos e químico, foram eficazes no controle de *S. sclerotiorum* nas sementes de feijão (Tabela 1). Os isolados CEN287 e CEN316 foram estatisticamente similares ao tratamento Carboxin+Thiram, demonstrando que são altamente específicos para o controle de *S. sclerotiorum*, com redução de 90% e 92% da incidência do patógeno, respectivamente.

A especificidade de CEN316 em parasitar hifas de *S. sclerotiorum*, *in vitro*, foi relatada por Oliveira *et al.* (2008), enquanto que para CEN287 essa propriedade foi verificada *in vitro*, em estudos com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Carvalho *et al.*, 2008). Dentre os mecanismos de controle biológico conhecidos, o hiperparasitismo está em

evidência para estes dois isolados, no controle de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão. Uma possível explicação para o antagonismo destes dois isolados contra o patógeno, em contraste aos demais isolados de *Trichoderma*, reside no fato de que o conjunto de mecanismos de controle biológico, incluindo o hiperparasitismo, pode variar entre espécies e entre isolados de uma mesma espécie (Martins-Corder & Melo, 1998).

O tratamento de sementes com *Trichoderma* tem controlado diversos patógenos de solo, como *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani*, causadores do tombamento de plantas (Pomella & Ribeiro, 2009). O presente trabalho mostrou a eficiência do antagonista contra *S. sclerotiorum*, pois houve redução de 90-92% da incidência deste patógeno nas plântulas oriundas de sementes artificialmente contaminadas.

### **Teste de germinação e vigor**

Para o teste de germinação e vigor com as sementes naturalmente contaminadas por *Cladosporium* spp. e *Aspergillus* spp., todos os tratamentos permitiram a obtenção de mais de 90% de plântulas normais após nove dias em germinador (Tabela 1). Apenas CEN290 não diferiu da testemunha quanto ao percentual de plântulas normais. No experimento com sementes artificialmente contaminadas com *S. sclerotiorum*, os tratamentos biológicos e o fungicida químico foram similares entre si, proporcionando percentual de plântulas normais (84,5 a 92%) significativamente superiores à testemunha (76%). As sementes tratadas com CEN287, CEN289, CEN290 e CEN316 não foram afetadas pelo patógeno *S. sclerotiorum* quanto à germinação com emissão de plântulas normais, aos nove dias em germinador (Tabela 1). Entretanto, a média geral dos tratamentos para o número de plântulas normais (Tabela 1) evidenciou redução significativa na germinação e vigor do feijoeiro, com a infecção das sementes por *S. sclerotiorum*.

Mesmo com alta incidência de *Cladosporium* spp. (97%) e *Aspergillus* spp. (49,5%) nas sementes, o percentual de plântulas normais aos nove dias foi de 90,5% para a testemunha (Tabela 1). Esses fungos provavelmente ficaram confinados ao tegumento da semente durante o processo de emergência e, com seu desprendimento dos cotilédones, impediu-se a transmissão dos patógenos, resultando em plântulas sadias. Esse mecanismo de escape de plântulas a patógenos também foi verificado por Henning & França Neto (1980) em sementes de soja com elevados índices de *Phomopsis* sp., capazes de germinarem e emergirem normalmente quando semeadas em substrato areia, desde que providas de adequada umidade e temperatura. De forma análoga, o escape de sementes a outros fungos

como *Fusarium* spp. também foi constatado por França Neto & Henning (1984) e Mertz *et al.* (2009).

*Sclerotinia sclerotiorum* foi prejudicial à germinação das sementes e ao rápido desenvolvimento de plântulas normais. A infecção e infestação das sementes com este patógeno reduziram em 16% o estande da testemunha. O tratamento das sementes com CEN287, CEN289, CEN290 e CEN316 foi importante para a manutenção do vigor das sementes.

### **Promoção de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação**

Os tratamentos CEN289, CEN290 e Carboxin+ Thiram apresentaram valores médios de comprimento das raízes (16,0; 16,9 e 16,4 cm, respectivamente) e do comprimento total das plantas (35,3; 35,1 e 35,0 cm, respectivamente) superiores aos da testemunha (14,2 e 33,4 cm, respectivamente). Os valores médios de comprimento da parte aérea foram estatisticamente similares para todos os tratamentos e variou entre 17,9 e 19,5 cm (Tabela 2).

A capacidade de *Trichoderma* promover o vigor e crescimento inicial de plantas de feijoeiro foi relatada por Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) e confirmada neste trabalho (Tabela 2). Tal efeito compensou a inferioridade estatística de CEN289 e CEN290 em relação aos isolados CEN287 e CEN316, quando se avaliou o potencial dos isolados no biocontrole de *S. sclerotiorum* em sementes. Desse modo, os quatro isolados influíram positivamente no vigor das sementes (Tabela 1).

### **Emergência de sementes e promoção de crescimento do feijoeiro em campo**

Os resultados em campo confirmaram os efeitos de CEN289, CEN290 e Carboxin+Thiram no crescimento das plantas. Assim como em casa de vegetação, os comprimentos médios das raízes (12,1; 13,1 e 11,7 cm, respectivamente) e total das plantas (20,8; 22,5 e 20,9 cm, respectivamente) destes três tratamentos foram superiores aos da testemunha (10,8 e 19,7 cm, respectivamente) e demais isolados de *Trichoderma* (Tabela 3). Os valores médios de comprimento da parte aérea foram similares para todos os tratamentos e ficaram entre 7,9 e 9,4 cm.

Os tratamentos foram similares quanto ao percentual de emergência tanto em casa de vegetação (74 a 85%) quanto em campo (68 a 83%). Em concordância com estes resultados apresentados, Mertz *et al.* (2009) relataram que maiores porcentagens de emergência de



sementes após tratamentos com *Trichoderma* spp. foram garantidas quando fornecida a umidade adequada, o que possibilita a ação dos agentes biológicos que, ao conferirem proteção às sementes contra fungos habitantes do solo, asseguraram bom estande.

A eficiência de *Trichoderma* no tratamento de sementes depende de fatores como temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota presente, aeração, pH e teor de matéria orgânica, decisivos para a maior ou menor sobrevivência do antagonista no solo ou substrato (Howell, 2003). Outros aspectos a serem considerados são a concentração de inóculo e a técnica de incorporação do mesmo, aliados ao vigor das sementes utilizadas (Harman, 2000).

Ao se proporcionar as condições favoráveis ao desempenho do antagonista, obtém-se diversos efeitos benéficos, tais como a prevenção do tombamento de plântulas, a exemplo do que foi verificado com algodoeiro em relação à incidência de *Pythium* sp., quando as sementes foram tratadas com *Trichoderma* spp. (Howell, 2007). Os resultados aqui apresentados, demonstram os benefícios do controle biológico sobre o desenvolvimento inicial do feijão comum, essencial para a formação de estande adequado nas lavouras. Para outras culturas, há que se estudar caso a caso, pois as interações nos diversos patossistemas são variáveis, especialmente ao se associarem aos antagonistas, fatores ambientais específicos. Pesquisas nas áreas citadas podem sanar problemas relativos a falhas no biocontrole de fitopatógenos, frequentemente ocasionadas pelo desconhecimento da ecologia e da fisiologia dos microrganismos utilizados para esse fim, em ecossistemas naturais (Melo, 1996).

### **Rizocompetência dos isolados de *Trichoderma harzianum***

Os isolados CEN288, CEN289 e CEN290 foram similares entre si e superiores aos demais quanto ao percentual de colonização dos fragmentos de raízes de plântulas de feijoeiro, considerando-se os cinco centímetros iniciais (88,7%, 82,5% e 92,5%, respectivamente). Por outro lado, CEN287 e CEN316 foram os isolados com os menores percentuais de colonização das raízes nos cinco centímetros iniciais e finais (37,5 e 30%; 22,5 e 15%, respectivamente). Não foi detectada a colonização de raízes por *T. harzianum* na testemunha (Tabela 4).

Os resultados deste trabalho estão em concordância com Vinale *et al.* (2008), espécies do gênero *Trichoderma* são capazes de solubilizar nutrientes da rizosfera, tornando-os disponíveis à absorção pelas raízes, e produzir metabólitos secundários que

podem atuar como análogos de auxinas. Já Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) mostraram que o crescimento inicial de plantas de feijoeiro comum, até o estágio V3, foi incrementado na presença de isolados de *Trichoderma* com competência rizosférica. Entre os sete melhores isolados selecionados por esses pesquisadores, alguns não se revelaram produtores de antibióticos, fitohormônios ou sideróforos, tampouco foram capazes de solubilizar fosfatos. Tais resultados demonstram a importância da rizocompetência na promoção do crescimento inicial de plantas de feijoeiro. Em concordância com essas conclusões, observou-se neste trabalho que os dois isolados capazes de promover crescimento inicial do feijoeiro 'Jalo Precoce' em casa de vegetação e campo (CEN289 e CEN290) figuraram entre os três melhores isolados quanto à competência rizosférica (Tabela 4).

A média geral do percentual de raízes colonizadas sofreu um decréscimo significativo de 65,2% (5 cm iniciais) para 39,16% (5 cm finais). Dentre os quatro isolados com maiores percentuais de colonização das raízes (isolado comercial, CEN288, CEN289 e CEN290), apenas CEN290 manteve os percentuais de colonização similares nos dois perfis: 92,5 e 81,25% nos 5 cm iniciais e finais, respectivamente. Esses resultados permitem indicar CEN290 como o melhor isolado para promover o crescimento inicial do feijoeiro comum 'Jalo Precoce' e colonizar as raízes em toda sua extensão.

Portanto, foram demonstradas as possibilidades de controle de patógenos e de promoção do crescimento do feijoeiro comum, por meio do tratamento de sementes com *T. harzianum*. Ao possibilitar a inserção de agentes microbianos nos sistemas produtivos desta cultura, pode-se optar pelo manejo da cultura com menor dependência de insumos químicos, assim como se esperar por maiores produtividades, devido ao melhor estabelecimento do estande inicial.

## CONCLUSÕES

O tratamento de sementes de feijão com *T. harzianum* pode reduzir a incidência de *Aspergillus* spp. *Cladosporium* spp. e *S. sclerotiorum* nas sementes, ocasionando melhor sanidade e vigor das plântulas; os isolados de *T. harzianum* (CEN289 e CEN290), por apresentarem interação positiva com as raízes do feijoeiro comum 'Jalo Precoce', podem ser usados como bioinoculantes, visando incrementar o crescimento inicial desta espécie.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por uma bolsa de doutorado e à FAP-DF, pelo apoio financeiro concedido ao projeto.

## REFERÊNCIAS

AGÜERO, L.E.M.; ALVARADO, R.; MARTÍNEZ, A.; DORTA, B. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* Rifai. **Interciência**, v.33, p.219-222, 2008.

ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G. Relationships between grain yield and accumulation of biomass, nitrogen and phosphorus in common bean cultivars. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1977-1986, 2008.

BARBOSA, M.A.G.; REHN, K.G.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.98-104, 2001.

CARVALHO, D.D.C.; OLIVEIRA, T.A.S.; BRAÚNA, L.M.; MELLO, S.C.M. Isolados de *Trichoderma* sp. antagonicos a *Fusarium oxysporum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 5p. (**Comunicado Técnico**, 178).

CORRÊA, B.O.; MOURA, A.B.; DENARDIN, N.D.; SOARES, V.N.; SCHÄFER, J.T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p.156-163, 2008.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.1023-1030, 2003.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; FLORES, M.G.V. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciência Rural**, v.37, p.1794-1797, 2007.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais**. São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1984. 39p.

GOMES, D.P.; BARROZO, L.M.; SOUZA, A.L.; SADER, R.; SILVA, G.C. Efeito do vigor e do tratamento fungicida nos testes de germinação e de sanidade de sementes de soja. **Bioscience Journal**, v.25, p.59-65, 2009.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.43-56, 2004.

HENNING, A.A.; FRANÇA-NETO, J.B. Problemas na avaliação de germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 2, n. 3, p. 9-22, 1980.

HOWELL, C.R. Effect of seed quality and combination fungicide-*Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and postemergence damping-off in cotton. **Phytopathology**, v.97, p.66-71, 2007.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, p.4-10, 2003.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v.51, p.409-416, 2009.

ITO, M.F.; CASTRO, J.L.; MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D. Importância do uso de sementes sadias de feijão e tratamento químico. **O Agrônomo**, v.55, p.14-16, 2003.

KRISHNAMURTHY, Y.L.; SHASHIKALA, J. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, p.469-474, 2006.

LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A.M.; CARVALHO, D.D.C.; COBUCCI, T. Uso de cultivares de feijão comum com arquitetura ereta e ciclo precoce para escape do mofo branco. Santo Antônio de Goiás: Embrapa-Cnpaf, 2009. 4p. (**Comunicado técnico**, 182).

MARINO, R.H.; MESQUITA, J.B. Micoflora de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do Estado de Sergipe. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, p.252-256, 2009.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, v.55, p.01-07, 1998.

MATHIVANAN, N.; PRABAVATHY, V.R.; VIJAYANANDRAJ, V.R. Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield in rice. **Journal of Phytopathology**, v.153, p.697-701, 2005.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.261-295, 1996.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v.39, p.13-18, 2009.

OLIVEIRA, T.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. Avaliação da atividade antagonista *in vitro* de isolados de *Trichoderma* sp. para biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 7p. (Comunicado Técnico, 177).

PARISI, J.J.D.; PATRÍCIO, F.R.A., OLIVEIRA, S.H.F. Método do rolo de papel toalha modificado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, **Summa Phytopathologica**, v.32, p.288-290, 2006.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R.R.; CARNEIRO, J.E.S.; ANDRADE, M.J.B.; REZENDE, A.M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009**. Viçosa: EPAMIG-CTZM, 2008, 180p.

POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S. Controle Biológico com *Trichoderma* em Grandes Culturas – Uma Visão Empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.239-244.

REGRAS para análise de sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 399p.

RESENDE, M.L.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, R.G.; VIEIRA, A.R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.793-798, 2004.

SAMUELS, G.J.; CHAVERRI, P.; FARR, D.F.; MCCRAY, E.B. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory**. ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em 11 dez. 2009.

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.456-458, 2004.

TU, J.C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of Phytopathology**, v.121, p.40-50, 1988.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p.1-10, 2008.

ZUCCHI, T.D.; MELO, I.S. Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.69-94.

**Tabela 1.** Incidência de fungos em sementes e plântulas de feijão ‘Jalo Precoce’ tratadas com *Trichoderma* e o respectivo efeito de cada tratamento sobre a germinação. Santo Antônio de Goiás, GO, 2009<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Incidência (%)			Germinação (%)	
	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Plântulas normais <sup>(2)</sup>	Plântulas normais <sup>(3)</sup>
CEN287	57,0 c	22,0 b	5,0 a	94,5 bA	92,0 bA
CEN288	83,0 e	29,0 c	12,0 b	94,5 bB	85,0 bA
CEN289	69,5 d	19,5 b	11,5 b	94,0 bA	90,5 bA
CEN290	81,0 e	35,0 c	11,5 b	90,5 aA	89,5 bA
CEN316	59,0 c	32,0 c	4,0 a	96,0 bA	91,0 bA
isolado comercial	32,0 b	31,0 c	14,0 b	98,0 bB	84,5 bA
Carboxin+Thiram	0,0 a	0,0 a	1,0 a	95,5 bB	89,5 bA
Testemunha	97,0 f	49,5 d	52,0 c	90,5 aB	76,0 aA
Média	-	-	-	94,2 B	87,2 A
Coefficiente de Variação	13,51 %	24,34 %	22,76 %	2,87 %	5,17 %

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). <sup>(2)</sup>Sementes naturalmente contaminadas por *Cladosporium* spp. e *Aspergillus* spp. <sup>(3)</sup>Sementes artificialmente contaminadas com *Sclerotinia sclerotiorum* (C-54-01).

**Tabela 2.** Emergência em areia aos 10 dias após semeadura (DAS), comprimento da parte aérea, de raiz e total de plantas de feijoeiro ‘Jalo Precoce’ (14 DAS) cultivadas em substrato tratado com isolados de *Trichoderma* em casa de vegetação. Santo Antônio de Goiás, GO, 2009<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Emergência em areia (%)	Comprimento (cm)		
		Parte aérea	Raízes	Total
CEN287	81	18,2	14,5 a	32,7 a
CEN288	85	18,6	14,3 a	32,9 a
CEN289	76	19,3	16,0 b	35,3 b
CEN290	80	18,2	16,9 b	35,1 b
CEN316	77	19,5	14,3 a	33,8 a
isolado comercial	83	17,9	14,9 a	32,8 a
Carboxin+Thiram	85	18,7	16,4 b	35,0 b
Testemunha	74	19,2	14,2 a	33,4 a
Coefficiente de Variação	12,41%	8,67 %	12,07 %	6,62 %

<sup>(1)</sup>Valores sem letras minúsculas não foram significativos segundo análise de variância e, seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 3.** Emergência em campo (aos 8 DAS), comprimento da parte aérea, de raiz e comprimento total de plantas de feijoeiro ‘Jalo Precoce’ (aos 10 DAS) cultivadas em sulcos tratados com *Trichoderma* em campo experimental (Pivô central). Santo Antônio de Goiás, GO, 2009<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Emergência em campo (%)	Comprimento (cm)		
		Parte aérea	Raízes	Total
CEN287	71	7,9	10,1 a	18,0 a
CEN288	81	8,5	10,1 a	18,6 a
CEN289	83	8,7	12,1 b	20,8 b
CEN290	79	9,4	13,1 b	22,5 b
CEN316	72	9,4	9,9 a	19,4 a
isolado comercial	81	9,1	10,7 a	19,8 a
Carboxin+Thiram	81	9,3	11,6 b	20,9 b
Testemunha	68	8,8	10,8 a	19,7 a
Coefficiente de Variação	14,59 %	17,26 %	16,23 %	12,17 %

<sup>(1)</sup>Valores sem letras minúsculas não foram significativos segundo análise de variância e, seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 4.** Competência rizosférica de isolados de *T. harzianum* aplicados às sementes de feijoeiro ‘Jalo Precoce’ e em areia lavada autoclavada, em casa de vegetação. Santo Antônio de Goiás, GO, 2010<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Raízes de feijoeiro (10 DAS) colonizadas por <i>Trichoderma</i> (%)	
	5 cm iniciais (%)	5 cm da extremidade (%)
CEN287	37,5 bA	22,5 bA
CEN288	88,7 dB	52,5 cA
CEN289	82,5 dB	28,8 bA
CEN290	92,5 dA	81,2 dA
CEN316	30,0 bA	15,0 aA
isolado comercial	60,0 cB	35,0 bA
Testemunha	0 aA	0 aA
Média	65,2 B	39,2 A
Coefficiente de Variação	17,49%	32,13%

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

## **CAPÍTULO 2**

**Antagonismo *in vitro* e aplicação foliar de *Trichoderma harzianum* para controle do mofo branco do feijão comum**

**(Versão modificada para submissão ao periódico *European Journal of Plant Pathology*)**



## RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o antagonismo *in vitro* de cinco isolados de *Trichoderma harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) contra *Sclerotinia sclerotiorum* e seu efeito no controle do mofo branco do feijão comum, em condições de campo. Os isolados foram inicialmente confrontados *in vitro* com o patógeno em testes de cultura pareada e antibiose a 25°C, cujas amostras foram preparadas para observação do antagonismo em microscopia de luz (ML). Posteriormente, em experimentos de campo com feijão 'Pérola', os antagonistas foram avaliados junto a uma testemunha infestada com *S. sclerotiorum* e sem *Trichoderma* e um isolado comercial, em aplicações aos 42 e 52 dias após o semeio (DAS) em 2009 e aos 52 DAS em 2010. Utilizaram-se 1500 mL de suspensão ( $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) para cada parcela de 6,25 m<sup>2</sup>. O delineamento foi em blocos casualizados com 4 repetições. A avaliação da densidade de *S. sclerotiorum* (apotécios/m<sup>2</sup>), da severidade de mofo branco e da produção foram efetuadas aos 62, 72 e 97 DAS, respectivamente. Exceto CEN290, todos os isolados apresentaram antagonismo *in vitro* contra o patógeno, nos testes de antibiose. Apenas CEN316 exerceu hiperparasitismo sobre o patógeno, nas imagens de ML. Nos testes em campo, os isolados CEN287, CEN316 e o isolado comercial proporcionaram a maior redução do inóculo de *S. sclerotiorum* em comparação à testemunha, nas safras 2009 e 2010 (46 e 73%; 58 e 61%; 62 e 52%, respectivamente). Em ambos os anos, a severidade de doença foi proporcional à densidade de inóculo do patógeno (P<0,01), o que possibilitou selecionar CEN287, CEN316 e o isolado comercial como bons agentes de biocontrole, conforme a menor severidade do mofo branco nas duas safras (6,7 e 2,3%; 7,5 e 11,7%; 6,7 e 9,2%, respectivamente), em comparação à testemunha (28,5 e 58,7%). Não houve diferença significativa para produtividade, cujos valores variaram entre 1820 e 2162 kg ha<sup>-1</sup> e 2285 e 3471 kg ha<sup>-1</sup> para as safras de 2009 e 2010, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*, metabólitos, controle biológico, densidade de inoculo, severidade.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antagonism of five isolates of *Trichoderma harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 and CEN316) against *Sclerotinia sclerotiorum* and its effect in the control of white mold of common bean, under field conditions. Initially, isolates were confronted with the pathogen *in vitro* by paired culture and antibiosis assays at 25°C, which samples were prepared for observation on light microscopy (LM). Subsequently, under field conditions using bean cv. 'Pérola', antagonists were evaluated together with an absolute control and commercial isolate, with applications at 42 and 52 days after sowing (DAS) in 2009 and 52 DAS in 2010. A suspension of 1500 mL ( $10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>) was used for each microplot of 6.25 m<sup>2</sup>. Treatments were composed by four microplots in randomized block design. The inoculum density of *S. sclerotiorum* (apothecia/m<sup>2</sup>), assessments of white mold severity and harvest were made at 62, 72 and 97 DAS, respectively. Except CEN290, all isolates presented *in vitro* antagonism against the pathogen, in the antibiosis assays. Only CEN316 parasitized the pathogen, in the ML images. In field assays, CEN287, CEN316 and commercial isolate were able to reduce inoculum density of *S. sclerotiorum* compared to the absolute control, in the harvests of 2009 and 2010 (46 and 73%; 58 and 61%; 62 and 52%, respectively). In both years, disease severity was proportional to the inoculum density ( $P < 0.01$ ), enabling to select CEN287, CEN316 and commercial isolate as biocontrol agents, due to lower severity of white mold in the two harvests (6.7 and 2.3%; 7.5 and 11.7%; 6.7 and 9.2%, respectively), compared to absolute control (28.5 and 58.7%). No significant difference was verified for productivity, which values vary from 1820 to 2162 kg ha<sup>-1</sup> and from 2285 to 3471 kg ha<sup>-1</sup> for harvests of 2009 and 2010, respectively.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, metabolites, biological control, inoculum density, severity.

## INTRODUÇÃO

O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, vem se tornando um problema cada vez mais sério do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil, independentemente do sistema de manejo da cultura utilizado, como sucessão cultural, plantio direto, ou mesmo rotação de cultura (Paula Júnior *et al.*, 2008). A fonte de inóculo inicial do patógeno são os escleródios, estruturas de resistência que podem apresentar germinação miceliogênica, infectando diretamente as plantas, e carpogênica, originando apotécios, os quais liberam os ascósporos infectivos à parte aérea das plantas (Purdy, 1979). A disseminação nas lavouras é promovida principalmente pela infecção de plantas por ascósporos e produção de novos escleródios, que permanecem viáveis no solo por períodos de até oito anos (Parisi *et al.*, 2006).

Os fungicidas são a forma frequente de controle utilizada em campo, para controle do mofo branco. Em áreas altamente infestadas, podem ser necessárias várias aplicações em volume que supera o usado para herbicidas e inseticidas, onerando os custos da produção (Vinale *et al.*, 2008). Por outro lado, tais produtos, em muitos casos, não proporcionam resultados satisfatórios e, ao longo do tempo, contaminam o ambiente com resíduos tóxicos (Naseby *et al.*, 2000).

O controle biológico de patógenos de plantas possui uma série de vantagens em relação aos pesticidas convencionais. Enquanto os fungicidas químicos apresentam somente um efeito temporário e usualmente necessitam aplicações repetidas durante o período de crescimento da cultura, os agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer, colonizar e de se reproduzirem no ecossistema, além de constituírem em uma alternativa para diminuir o potencial de inóculo do solo sem trazerem danos ao ambiente (Harman *et al.*, 2004).

Como exemplo de microrganismos amplamente utilizados como agentes de controle biológico, cita-se o gênero *Trichoderma*, considerado componente ativo da microbiota do solo (Almeida *et al.*, 2007). A atuação desse fungo no biocontrole de doenças compreende um processo complexo que pode ocorrer por diferentes mecanismos ou por uma combinação destes, como antibiose, competição por nutrientes e micoparasitismo (Howell, 2003; Celar, 2003), dentre outros. Como vantagem adicional, *Trichoderma* pode ter efeito promotor do crescimento de plantas (Vinale *et al.*, 2008).

No Brasil, pelo menos 13 empresas produzem e comercializam produtos à base de *Trichoderma* para controle biológico de doenças (Morandi & Bettiol, 2009). Porém, a

eficiência das diversas espécies deste antagonista em campo, no controle do mofo branco, não está bem estabelecida e, eventualmente, ocorrem falhas no biocontrole de fitopatógenos, por falta de conhecimento da ecologia e da fisiologia dos microrganismos utilizados para esse fim (Melo, 1996). Um considerável esforço em pesquisas é necessário para melhorar a eficácia de agentes de controle biológico, através de seleção de isolados, melhorias na formulação, vida de prateleira e melhores estratégias de aplicação (Huang *et al.*, 2000; Kolombet *et al.*, 2008). Além da capacidade de sobrevivência do agente de biocontrole no solo, a produção de metabólitos tóxicos aos fitopatógenos e a estabilidade metabólica de tais substâncias são importantes características para iniciar um programa de seleção de novos isolados de *Trichoderma* (Kemerly & Stack, 1987).

Os solos brasileiros abrigam uma grande diversidade de *Trichoderma*, que pode ser avaliada para a seleção de isolados eficientes para o controle biológico (Louzada *et al.*, 2009). Cinco isolados de *T. harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) foram previamente selecionados por Oliveira *et al.* (2008) e Carvalho *et al.* (2008) *in vitro* contra patógenos habitantes do solo que atacam a cultura do feijoeiro. Sua eficiência em ambiente controlado motivou a realização de testes posteriores, que incluíram verificar sua eficácia em agroecossistemas. Assim, este trabalho objetivou avaliar o antagonismo *in vitro* desses isolados contra *S. sclerotiorum* e seu efeito no controle do mofo branco do feijoeiro, em condições de campo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolados de *Trichoderma harzianum***

Os cinco isolados (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) de *T. harzianum* empregados neste trabalho são integrantes da Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN, Brasília, DF), onde foram realizados os testes *in vitro*. Para obtenção destes isolados, amostras de solo procedentes de área cultivada com algodoeiro do Distrito Federal foram coletadas a 5-20 cm de profundidade e processadas segundo o método de diluição seriada em meio Martin (1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 5 g peptona; 10 g dextrose; 0,03 g rosa de Bengala; 16 g ágar e 1L de água destilada). A incubação das colônias ocorreu em incubadora tipo BOD (Fanen, modelo 347) à temperatura de 25°C e ausência de luz, durante cinco dias. Após esse período, as colônias típicas do gênero

*Trichoderma* foram purificadas e preservadas em nitrogênio líquido. Os isolados foram identificados como pertencentes à espécie *T. harzianum*, em conformidade com Samuels *et al.* (2009). Para a execução deste trabalho, os isolados foram reativados, em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a partir das amostras mantidas em nitrogênio líquido.

#### **Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* - Cultura pareada**

Como etapa de um programa de seleção de agentes de biocontrole, os isolados deste estudo foram submetidos a diferentes testes *in vitro* entre março e dezembro de 2008 antes de serem avaliados em campo. Nesse contexto, a verificação do antagonismo dos isolados de *T. harzianum* contra *S. sclerotiorum* foi realizada conforme metodologia adaptada de cultura pareada descrita por Dennis & Webster (1971). Para tanto, proporcionou-se o pré-estabelecimento de *S. sclerotiorum* (isolado C-54-01), que foi repicado dois dias antes dos antagonistas. Discos de 5mm retirados de culturas do patógeno e dos antagonistas foram posicionados diametralmente opostos em placas contendo meio BDA solidificado e incubados a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Aos 7 dias de cultivo dos dois fungos, foram medidos o crescimento radial das colônias de *S. sclerotiorum*. Aos 10 dias, foram atribuídas notas de acordo com a escala estabelecida por Bell *et al.* (1982) (Nota 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Nota 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Nota 3: *Trichoderma* ocupa aproximadamente metade da superfície do meio; Nota 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Nota 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa). Os experimentos foram conduzidos duas vezes, com quatro repetições.

#### **Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *T. harzianum* sobre *Sclerotinia sclerotiorum***

Após um dia de crescimento de *S. sclerotiorum* (C-54-01) em BDA a 25° C e fotoperíodo de 12 h, bases de outras placas de Petri de tamanho correspondente, contendo meio BDA solidificado, receberam no seu centro um disco de ágar contendo micélio dos antagonistas. As bases das placas contendo o antagonista recém repicado e o patógeno foram sobrepostas e unidas com filme plástico transparente. As placas foram incubadas de forma que as bases superiores fossem aquelas que continham o patógeno. Após a colônia testemunha (base correspondente contendo apenas BDA solidificado) encontrar-se totalmente colonizada, mediu-se o diâmetro (média de duas medições diametralmente

opostas) das colônias de *S. sclerotiorum*. Os valores médios de percentagens de inibição pelos metabólitos voláteis (mv) foram obtidos em relação ao crescimento da testemunha. Considerou-se 100% de crescimento a área final ocupada pela testemunha menos a área inicial.

Para verificar a ação de metabólitos não voláteis (mnv), filtrados das culturas de *Trichoderma* foram incorporados ao meio. Cinco discos (5 mm) contendo micélio de *T. harzianum* foram transferidos para frascos Erlenmeyer (500 mL), contendo 250 mL de meio BD (batata-dextrose). Após cinco dias de cultivo em agitador orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160) a 250 rpm e temperatura de 25° C, em ausência de luz, as culturas foram filtradas, com auxílio de bomba a vácuo. Cada isolado passou por três filtrações, com 1, 2 e 3 papéis de filtro, respectivamente. A parte líquida foi esterilizada por filtração (filtro Millipore 0,45µm). Cinco mililitros do filtrado de cada isolado foram acrescidos a 15 mL de BDA fundente contendo ágar a 28%, em placa de Petri. Após solidificação do meio, um disco de ágar (5 mm) contendo micélio do patógeno foi depositado sobre o meio. Para a testemunha, adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada ao BDA fundente. As placas foram mantidas a 25° C e fotoperíodo de 12 h, até completa colonização do meio pelo patógeno, nas placas da testemunha, que se deu no quinto dia. Tomaram-se, então, as medidas de diâmetro das colônias do patógeno. Os valores obtidos foram convertidos em percentagem do crescimento da testemunha, conforme item anterior. Os experimentos com metabólitos voláteis e não voláteis foram conduzidos duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada isolado de *Trichoderma*.

### **Estabilidade térmica de metabólitos antifúngicos não voláteis produzidos por *Trichoderma harzianum***

Para a avaliação da estabilidade térmica dos metabólitos de *T. harzianum*, os extratos fúngicos dos antagonistas foram preparados a partir de cultivo em meio líquido BD, conforme especificado no item anterior. Alíquotas de 45 mL desses extratos foram autoclavadas a 121 °C durante 21 minutos e, então, incorporadas em 135 mL de meio BDA fundente (28% de ágar), que foi distribuído em placas de Petri. Após solidificação do meio, cada placa recebeu em seu centro, um disco de 5 mm de BDA com micélio retirado de culturas de *S. sclerotiorum* com 6 dias de crescimento. As placas (4 repetições/tratamento) foram incubadas em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas

diariamente até o 5º dia, tomando-se leituras dos diâmetros das colônias e os dados, convertidos em porcentagem, considerando-se a média do crescimento da testemunha (placas sem a adição de metabólitos) como 100%. Para as análises estatísticas, considerou-se a última leitura.

### **Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotinia sclerotiorum***

Para o estudo das interações entre os cinco isolados de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*, aos 10 dias de cultivo pareado, discos de micélio (5mm) da região de confronto entre patógeno e antagonista foram transferidos para lâminas microscópicas e observados sob lentes de 40x em microscópio de luz Leica Microstar IV. Esse experimento foi conduzido em triplicata e as imagens foram capturadas com câmera digital Sony Cyber Shot DSC-S730. Neste experimento, avaliou-se a presença de parasitismo de *T. harzianum* sobre as hifas de *S. sclerotiorum*.

### **Condução dos experimentos de campo e aplicações dos agentes de biocontrole**

O desempenho dos isolados de *T. harzianum* em campo para controle de *S. sclerotiorum* foi avaliado na Embrapa Arroz e Feijão, com preparo de inóculo em laboratório. Discos de ágar contendo micélio dos isolados fúngicos foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL), contendo arroz parboilizado (15 g frasco<sup>-1</sup>), previamente umedecido (60% p v<sup>-1</sup>) e autoclavado (121°C; 40 min). Os frascos foram mantidos em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período, adicionou-se água destilada esterilizada aos frascos para, em seguida, recolher os esporos, que foram filtrados em gaze esterilizada. As concentrações empregadas para aplicação no campo foram ajustadas em câmara de Neubauer para 3 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>.

Os experimentos de campo foram conduzidos nos anos de 2009 e 2010 (julho a outubro), na Fazenda Palmital, da Embrapa Arroz e Feijão, situada no município de Goianira, Goiás (16°26'04,18"S; 49°24'06,80"W), a 735m de altitude. Nesta área havia uma pastagem, sem histórico de cultivo de culturas anuais. O solo da área foi classificado como de textura argilosa, com pH 6,6. Conforme análise de solo, estimou-se os teores de Ca, Mg, Al e H+Al em 3,24, 1,25, 0 e 3,35 cmolc/dm<sup>3</sup>; para P, K, Cu, Zn, Fe e Mn foram encontrados 11,6, 111, 2,9, 3,6, 110 e 50 mg/dm<sup>3</sup>, respectivamente e, quanto a matéria orgânica, 20 g/dm<sup>3</sup>. A temperatura média do ar foi estimada por meio de estação meteorológica em 21,2 e 21,5°C durante os experimentos conduzidos em 2009 e 2010,

respectivamente. Para a instalação de cada um dos experimentos, no mesmo local, uma área total correspondente a 400 m<sup>2</sup> (25 x 16 m) foi roçada, dessecada com duas aplicações de glifosato (2,5 L ha<sup>-1</sup>) para subsequente infestação do solo com escleródios obtidos em resíduos de pré-limpeza de soja colhida. A distribuição uniforme de escleródios pela área experimental foi feita a lanço para fornecer, em média, 145 escleródios/m<sup>2</sup>, conforme metodologia descrita por Huang *et al.* (2000). Em seguida, foi feita a semeadura direta do feijão ‘Pérola’ com semeadora regulada para 12 sementes metro linear<sup>-1</sup> e adubação com NPK 5-25-15, na quantidade recomendada de 400 kg ha<sup>-1</sup> (Paula Júnior *et al.*, 2008). Para o experimento de 2010, a área foi reinfestada utilizando-se o mesmo procedimento usado no ano anterior, com o plantio feito novamente por semeadura direta.

Cada tratamento foi composto por quatro parcelas experimentais, obedecendo ao delineamento em blocos casualizados, com cada parcela correspondendo a cinco linhas de plantio, espaçadas a cada 0,5 m, com 2,5 m de comprimento (2,5 x 2,5 m) (Huang *et al.*, 2000). Entre as parcelas experimentais, manteve-se 1 m de bordadura, além de outros 2,5 m de bordadura protegendo a área experimental total. As demais práticas culturais para cultivo convencional do feijoeiro, tais como irrigação, adubação nitrogenada, controle de pragas e plantas daninhas foram realizadas conforme Paula Júnior *et al.* (2008). Os experimentos foram irrigados por aspersão, ajustada para permitir o desenvolvimento adequado do feijoeiro e facilitar a formação de apotécios (Gerlagh *et al.*, 1999).

Os agentes de biocontrole foram aplicados duas vezes na safra de 2009, o ajuste em campo foi realizado para as aplicações na quantidade de 1500 mL de suspensão a 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup> para cada parcela de 6,25 m<sup>2</sup> (2,4 x 10<sup>12</sup> conídios ha<sup>-1</sup>), sendo a primeira aplicação com 5% de florescimento aos 42 dias após o semeio (DAS) e a segunda, 10 dias após a primeira (Huang *et al.*, 2000). O experimento foi irrigado logo após cada aplicação dos antagonistas, para que os conídios atingissem o solo. Para o experimento de 2010, realizou-se apenas uma aplicação, aos 42 DAS, nas mesmas concentrações mencionadas. Nas duas safras conduzidas, as suspensões de conídios foram uniformemente aplicadas sobre as parcelas usando pulverizador de compressão prévia (marca Guarany, modelo 417-02), com 3,8 L de capacidade. As plantas não foram irrigadas no dia seguinte após as aplicações do agente de controle biológico. Cada experimento foi composto por sete tratamentos, sendo os cinco isolados de *T. harzianum*, o produto Trichodermil<sup>®</sup> SC (isolado comercial de *T. harzianum*, Itaforte Bioprodutos, Itapetininga, SP) na mesma concentração



empregada para os isolados de *T. harzianum* e uma testemunha, sem aplicação de *Trichoderma*.

### **Avaliação do efeito de *Trichoderma harzianum* na densidade de inóculo do patógeno, na severidade do mofo branco e na produtividade do feijoeiro e seus componentes**

A densidade de inóculo de *S. sclerotiorum* foi determinada anualmente, e consistiu na concentração de apotécios/m<sup>2</sup> presentes na superfície do solo, no período de floração e formação das primeiras vagens, aos 62 DAS. As contagens foram feitas em 1 m<sup>2</sup>, na entrelinha central de cada parcela (Napoleão *et al.*, 2005).

A avaliação da severidade da doença foi feita em áreas correspondentes a 1 m<sup>2</sup> (2 áreas parcela<sup>-1</sup>), escolhidas ao acaso dentro de cada parcela, aos 72 DAS. A severidade do mofo branco foi estimada por meio de uma adaptação da escala de notas proposta por Napoleão *et al.* (2005). Assim, em cada área selecionada foram atribuídas notas de 1 a 7 (Nota 1: todas as plantas sadias; Nota 2: 1 a 5% de área coberta por sintomas; Nota 3: 6 a 20% de área coberta por sintomas; Nota 4: 21 a 50% de área coberta por sintomas; Nota 5: 51 a 70% de área coberta por sintomas; Nota 6: 71 a 90% de área coberta por sintomas; Nota 7: 91 a 100% de área coberta por sintomas e plantas mortas). Para as análises estatísticas, foi considerado o ponto médio de cada nota atribuída, o que permitiu expressar os resultados em porcentagem de área avaliada, de plantas com sintomas de mofo branco aos 72 DAS.

A colheita manual foi realizada em ambos os anos aos 97 DAS, nas duas linhas centrais de cada parcela, numa extensão de 1,5 m de comprimento. Todas as plantas colhidas nas parcelas foram submetidas à trilhagem manual, para a determinação da produtividade. Também foram coletadas 10 plantas de cada parcela para estimativa do número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de 100 grãos (Soratto *et al.*, 2004).

### **Análises estatísticas**

Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Estas análises e o teste t para análises de regressão e correlação entre todas as variáveis avaliadas foram realizadas no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* - Cultura pareada

Os valores médios de crescimento das colônias de *S. sclerotiorum* ao sétimo dia de cultivo pareado e as médias de notas do antagonismo ao 10º dia foram similares para todos os isolados de *T. harzianum* (Tabela 1). Pela classificação segundo a escala de Bell *et al.* (1982), as médias das notas dos isolados ficaram entre 1 e 2, tendo estes, ocupado entre 75 e 92% da superfície do meio.

**Tabela 1** – Antagonismo *in vitro* (cultura pareada) de *Trichoderma harzianum* contra *Sclerotinia sclerotiorum*<sup>(1)</sup>.

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Cultura pareada	
	Diâmetro médio das colônias de <i>S. sclerotiorum</i> (mm) ao 7º dia	<i>T. harzianum</i> quanto ao antagonismo ao 10º dia <sup>(2)</sup>
CEN287	36,6	1,3
CEN288	39,6	1,4
CEN289	35,0	1,5
CEN290	35,0	1,5
CEN316	40,3	1,5
Coefficiente de variação	8,65%	38,40%

<sup>(1)</sup>Valores não foram significativos segundo análise de variância ( $P \leq 0,05$ ). <sup>(2)</sup>Classificação do antagonismo segundo escala de Bell *et al.* (1982), Nota 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Nota 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Nota 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Nota 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Nota 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

A redução do crescimento de *S. sclerotiorum* em cultura pareada pode ser atribuída à competição por espaço e por nutrientes presentes no meio de cultura (Vinale *et al.*, 2008). Entretanto, os principais mecanismos de biocontrole utilizados por fungos do gênero *Trichoderma* quando confrontados com fungos fitopatogênicos, são o micoparasitismo (Howell, 2003) e a antibiose (Mohamed & Haggag, 2006), os quais foram também explorados no presente trabalho.

### Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *T. harzianum* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Quanto à produção de metabólitos voláteis, exceto CEN290, todos os isolados de *T. harzianum* exibiram ação antifúngica e não diferiram entre si (Tabela 2). Os valores médios de porcentagem de inibição verificaram-se entre 35 e 62%. Já no experimento para avaliações do efeito de metabólitos não voláteis, os isolados CEN287 e CEN316 se

destacaram dos demais, inibindo o crescimento do patógeno em 95 e 90%, respectivamente. Não houve correlação entre mv e mnv nas análises de relações do presente trabalho. Segundo Dennis & Webster (1971), a alta produção de antibióticos não voláteis não está correlacionada à alta produção de inibidores voláteis.

**Tabela 2** – Efeito inibidor de metabólitos voláteis, não voláteis e autoclavados de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Crescimento de colônias de <i>S. sclerotiorum</i> sob o efeito de metabólitos de <i>T. harzianum</i> (%) <sup>(1, 2)</sup>		
	Metabólitos voláteis	Metabólitos não voláteis	Metabólitos autoclavados
CEN287	55,8 aB	4,7 aA	54,9 aB
CEN288	52,1 aA	60,5 bA	50,0 aA
CEN289	65,9 aA	99,8 cB	63,9 aA
CEN290	85,8 bA	99,4 cB	100,0 cB
CEN316	38,2 aB	10,7 aA	76,7 bC
Testemunha <sup>(3)</sup>	100,0 bA	100,0 cA	100,0 cA
Média <sup>(5)</sup>	66,32 A	62,65 A	74,27 B
Coefficiente de variação	20,67%	12,15%	11,08 %

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). <sup>(2)</sup>Valores relativos a Testemunha, obtidos de colônias com 4, 5 e 5 dias de crescimento, para os ensaios com metabólitos voláteis, não voláteis e autoclavados, respectivamente. <sup>(3)</sup>Metabólitos voláteis: sem adição de disco do antagonista na placa correspondente; Metabólitos não voláteis: adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada ao BDA fundente das placas; Metabólitos autoclavados: meio BDA sem a adição de metabólitos de *T. harzianum*.

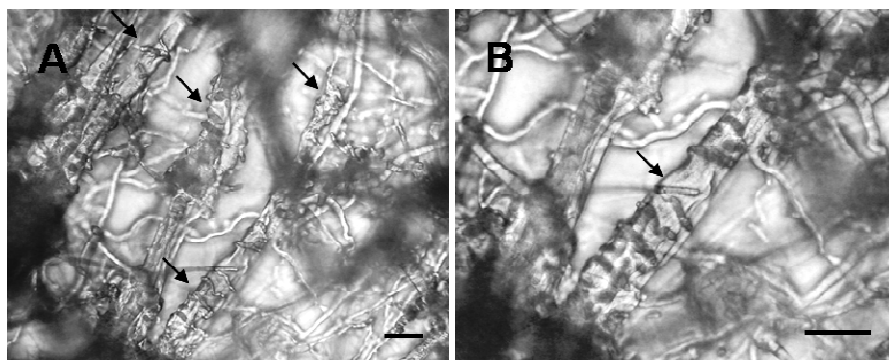
### **Estabilidade térmica de metabólitos antifúngicos produzidos por *Trichoderma harzianum***

Os metabólitos produzidos por CEN287, CEN288, CEN289 e CEN316 inibiram, após autoclavagem, 45%, 50%, 37% e 24% o crescimento de *S. sclerotiorum*, respectivamente. Embora tenha ocorrido um aumento no percentual médio do crescimento de colônias de *S. sclerotiorum*, sob efeito de metabólitos autoclavados de *T. harzianum* em comparação com os mv e mnv, o nível de termoestabilidade encontrado indica que o princípio ativo produzido por CEN288 pode se manter estável, independentemente das condições ambientais de temperatura. A antibiose constitui uma importante interação antagonista, pois há descrições de casos em que a taxa de secreção de antibióticos corresponde ao percentual de biocontrole, e após purificado, o antibiótico isolado mantém a mesma capacidade de biocontrole (Benítez *et al.*, 2004). Segundo Vinale *et al.* (2008), a especificidade de um isolado para exercer antibiose ocorre devido à produção de

metabólitos pertencentes a uma variedade de classes de compostos químicos, as quais podem sugerir diferentes mecanismos de ação. Estas avaliações são importantes porque a capacidade para produzir metabólitos tóxicos com efeito fungicida ou fungistático pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie (Martins-Corder & Melo, 1998).

### Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Dentre os cinco isolados, somente CEN316 demonstrou capacidade parasítica *in vitro* sobre *S. sclerotiorum*. O parasitismo foi confirmado em vários locais das hifas de *S. sclerotiorum* nas imagens de microscopia de luz (Figura 1A). As hifas de CEN316 foram observadas crescendo em torno e em toda a extensão das hifas do patógeno (Figura 1B).



**Figura 1** – Microscopia de luz da interação entre *Trichoderma harzianum* (CEN316) e *Sclerotinia sclerotiorum*: **A)** Setas mostrando hifas de CEN316 desenvolvendo sobre as hifas do patógeno; **B)** Detalhe de uma hifa de *S. sclerotiorum* colonizada pelo antagonista, em maior aumento. (Barras = 32 e 30  $\mu\text{m}$  para as figuras 1A e 1B, respectivamente).

Embora Ávila *et al.* (2005) e Moretini & Melo (2007) tenham utilizado microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificar interações de agentes de biocontrole e *S. sclerotiorum* em testes conduzidos *in vitro*, verificou-se neste trabalho que imagens satisfatórias, revelando interações de micoparasitismo, podem ser obtidas a partir de uma técnica mais simples (ML). Inbar *et al.* (1996), empregando MEV e ML em seus estudos, constataram colonização e enrolamento de hifas de *S. sclerotiorum* por *T. harzianum* também em testes conduzidos *in vivo*, a partir de amostras de solo estéril. As interações verificadas entre CEN316 e *S. sclerotiorum* podem ser consideradas como hiperparasitismo, que é definido como um processo complexo, consistindo de vários eventos, incluindo o reconhecimento do hospedeiro, que é atacado pelas hifas do antagonista com subsequente penetração dessas hifas (Agrios, 2005; Vinale *et al.*, 2008). Durante este processo, o fungo

*Trichoderma* pode também secretar enzimas ou mesmo produzir metabólitos secundários com propriedades antifúngicas, quando cultivados em meio de cultura (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991).

**Efeito de *Trichoderma harzianum* sobre a densidade de inóculo do patógeno, severidade do mofo branco e na produtividade do feijoeiro e seus componentes**

A infestação do solo foi bem sucedida e permitiu o desenvolvimento de epidemias de mofo branco nos dois anos de experimento, nos quais houve diferenças entre o desempenho dos tratamentos. Os isolados CEN287, CEN316 e o isolado comercial reduziram a densidade de inóculo do patógeno no solo nos dois experimentos (Tabela 3). A redução do número de apotécios/m<sup>2</sup> para estes três isolados foi de 46, 58 e 62% na safra 2009 e 73, 61 e 52% na safra 2010, respectivamente. O isolado CEN290 também reduziu o número de apotécios formados em 2009, mas não apresentou o mesmo efeito no ano seguinte, sob maior pressão de inóculo.

**Tabela 3** – Efeito de *Trichoderma harzianum* sobre o número de apotécios/m<sup>2</sup> e severidade do mofo branco em feijão comum ‘Pérola’ em campo. Goianira, GO, 2009 e 2010<sup>(1)</sup>.

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Apotécios/m <sup>2</sup> aos 62 DAS		Severidade: área coberta por mofo branco aos 72 DAS (%)	
	2009	2010	2009	2010
CEN287	6,7 aA	28,2 aB	6,7 aA	2,3 aA
CEN288	10,5 bA	114,2 bB	11,6 aA	33,7 bB
CEN289	17,5 cA	50,7 aB	27,5 bA	32,2 bA
CEN290	8,5 aA	85,7 bB	6,8 aA	32,2 bB
CEN316	5,2 aA	40,5 aB	7,5 aA	11,7 aA
Isolado comercial	4,7 aA	50,2 aB	6,7 aA	9,2 aA
Testemunha <sup>(2)</sup>	12,5 bA	105,5 bB	28,5 bA	58,7 cB
Média	9,39 A	67,89 B	13,62 A	25,76 B
Coeficiente de variação	21,61%	27,06%	25,36%	29,60%

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05). <sup>(2)</sup>sem aplicação de *Trichoderma*.

De forma análoga, CEN287, CEN316 e o isolado comercial foram os únicos que se apresentaram como bons agentes de biocontrole do mofo branco em condições de campo, nas duas safras, por terem reduzido a severidade de doença em 77, 74 e 76% na safra de 2009 e 96, 80 e 84% na safra de 2010, respectivamente, em comparação à testemunha. Mesmo com o aumento da severidade média geral do mofo branco de 2009 para 2010, esses três isolados mantiveram a eficiência em controlar a doença, representada pelo agrupamento das médias conforme o teste de Scott-Knot, nas duas safras.

Isolados de antagonistas selecionados *in vitro* podem ser incapazes de produzir os mesmos resultados em condições de campo (Kamilova *et al.*, 2007). Fatores ambientais como temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, comunidade microbiana do solo, aeração, pH e teor de matéria orgânica influenciam na sobrevivência de *Trichoderma* no solo ou substrato e, conseqüentemente, na sua capacidade antagônica (Cook & Baker, 1983; Howell, 2003). Devido à influência destas diversas variáveis, se verifica a importância da reprodutibilidade dos resultados em condições de campo. O isolado CEN316, que foi um dos melhores isolados nos testes de campo, foi o único que demonstrou capacidade parasítica nos testes *in vitro* (Figura 1). Além disso, CEN287 e CEN316 já haviam se destacado nos testes com mv (Tabela 2). Desta forma, é possível que o hiperparasitismo *in vitro* possa ser usado como critério para seleção de isolados, em detrimento dos demais métodos que não apresentaram correlação com os resultados em campo.

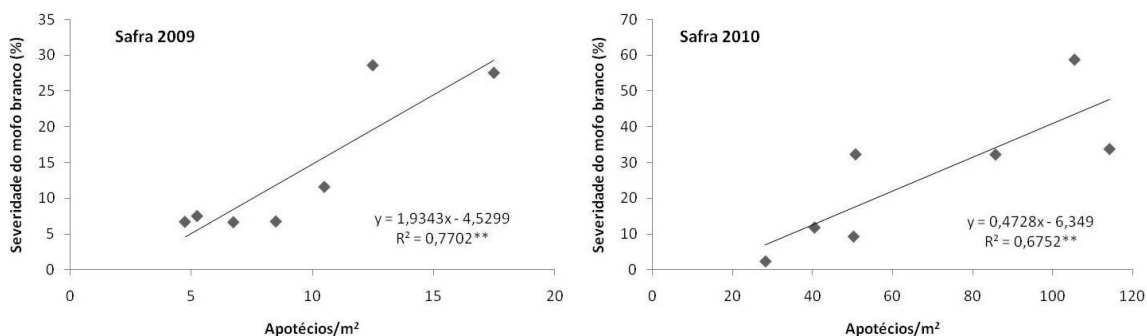
Uma seqüência lógica à seleção de antagonistas para controle biológico procede através de vários estágios, e em teoria é de *in vitro* (testes em placas de Petri) para *in vivo* (testes em campo) (Andrews, 1985). Embora se tenha relatado nenhuma relação entre testes de inibição *in vitro* e o desempenho de agentes de biocontrole no campo (Fravel, 2005), os resultados verificados no presente trabalho para CEN287 (mv) e CEN316 (MEV e mv), demonstraram a viabilidade do esquema de seleção de microorganismos antagonistas proposto por Andrews (1985).

Embora Huang *et al.* (2000) tenham verificado diminuição do percentual de plantas infectadas e de plantas mortas pelo mofo branco ao fazer uma segunda aplicação foliar de *Trichoderma*, 10 dias após a primeira aplicação, nosso estudo demonstrou que esta segunda aplicação pode ser dispensável. CEN287, CEN316 e o isolado comercial mantiveram sua capacidade de biocontrole no experimento realizado em 2010, o qual contou com uma aplicação e, ainda, sob maior pressão de doença.

O isolado CEN288 proporcionou severidade do mofo branco estatisticamente igual aos outros tratamentos efetivos, na safra de 2009, mesmo tendo apresentado número médio de apotécios/m<sup>2</sup> estatisticamente superior, aos 62 DAS. Nas condições deste experimento, esse isolado não foi capaz de reduzir a germinação carpogênica dos escleródios, uma conhecida e isolado-específica propriedade de *Trichoderma* no biocontrole de *S. sclerotiorum* (Abdullah *et al.*, 2008). O agrupamento de CEN288 com CEN287, CEN290, CEN316 e isolado comercial quanto a severidade de mofo branco aos 72 DAS em 2009,

pode ser justificado por um possível parasitismo dos apotécios de *S. sclerotiorum* em condições de campo (Wang & Vincelli, 1997).

A relação proporcional existente entre densidade de inóculo (62 DAS) e a severidade do mofo branco (72 DAS) nos dois anos de experimento foi demonstrada por modelos lineares simples (Figura 2).



**Figura 2** – Relação entre número médio de apotécios/m<sup>2</sup> e severidade (percentual de área coberta por mofo branco) da doença em feijão comum ‘Pérola’ em campo. Goianira, GO, 2009 e 2010. \*\*Significativo pelo teste t ( $P \leq 0,01$ ).

Os valores de  $R^2$  (0,77 e 0,67) encontrados para as relações entre estas duas variáveis indicam que não houve interferência da deriva de conídios de isolados de *Trichoderma* no momento das pulverizações ou de ascósporos de *S. sclerotiorum* para outras parcelas. Além disso, este resultado também demonstra que a ocorrência do mofo branco foi majoritariamente em decorrência da ação dos ascósporos provenientes dos apotécios produzidos dentro das parcelas. Bae e Knudsen (2007) relataram que o controle de *S. sclerotiorum* com *T. harzianum* foi menos efetivo quando havia um padrão de distribuição randômica de escleródios e apotécios na área experimental do que em áreas onde esta distribuição era mais concentrada. Nestas condições em que a migração de ascósporos de *S. sclerotiorum* para outras parcelas não ocorreu (ou foi minimizada), tanto no trabalho de Bae e Knudsen (2007), quanto nos resultados apresentados na Figura 2, os agentes de biocontrole proporcionaram resultados satisfatórios.

Na safra de 2009, a massa de 100 grãos foi superior para o isolado CEN287 em relação aos demais, sendo esta, a única diferença significativa direta observada para as médias da produtividade do feijoeiro e de seus componentes (Tabela 4).

**Tabela 4** – Produtividade de grãos de feijão comum ‘Pérola’ e seus componentes, considerando o efeito de *Trichoderma harzianum* na supressão do mofo branco em campo. Goianira, GO, 2009 e 2010<sup>(1)</sup>.

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Vagens		Grãos		Massa de 100 grãos		Produtividade de grãos (kg ha <sup>-1</sup> )	
	(n° por planta)		(n° por vagem)		(g)			
	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
CEN287	10,7	10,5	5,4	5,0	29,7 b	27,7	2162 A	3217 B
CEN288	9,8	12,2	5,1	5,1	26,5 a	25,7	1820	2285
CEN289	8,7	11,3	5,1	5,0	26,0 a	27,5	1950	2700
CEN290	9,1	8,5	5,2	5,1	26,0 a	27,1	2056	2744
CEN316	12,0	11,3	5,2	5,1	25,5 a	26,5	1944	2426
Isolado comercial	11,9	11,3	5,5	5,0	26,6 a	26,6	1929 A	3471 B
Testemunha <sup>(2)</sup>	8,4	9,4	5,2	5,3	26,9 a	25,1	1990	2555
Média	10,1	10,7	5,2	5,1	26,8	26,6	1979 A	2771 B
Coeficiente de variação	19,33%	29,36%	7,00%	10,11%	5,12%	6,29%	23,59%	22,07%

<sup>(1)</sup>Valores sem letras não foram significativos segundo análise de variância e, seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). <sup>(2)</sup>sem aplicação de *Trichoderma*.

Além disso, foi verificado o aumento da média geral da produtividade de grãos em kg ha<sup>-1</sup> de 2009 para 2010. Neste contexto, CEN287 e o isolado comercial foram os únicos tratamentos que mostraram esta tendência. Este resultado é um reflexo do efeito destes dois isolados no controle do mofo branco do feijoeiro, quando da reprodutibilidade do controle do mofo branco no ano seguinte, onde houve maior pressão da doença.

As médias de produtividade e seus componentes, apresentados na Tabela 4, foram semelhantes às obtidas por Santos & Fageria (2007), que estudaram o efeito do manejo de nitrogênio na produtividade de grãos da cultivar ‘Pérola’. A obtenção de grãos maiores verificada em CEN287 em 2009 pode ter sido proporcionada por um possível efeito promotor deste isolado no crescimento das plantas, com conseqüências na produtividade, uma conhecida propriedade de fungos do gênero *Trichoderma*, que pode produzir substâncias promotoras do crescimento das plantas (fitohormônios) ou ser capaz de solubilizar nutrientes da rizosfera, tornando-os disponíveis para a absorção pelas raízes (Vinale *et al.*, 2008). Como esta característica é muito variável e instável, essa pode ser uma razão pela qual os efeitos de CEN287 na massa de 100 grãos não tenham sido verificados em 2010.

Em conformidade com Huang *et al.* (2000), quando os tratamentos foram comparados dentro de um mesmo ano agrícola, a produtividade não foi significativamente afetada pelos antagonistas. Embora esse componente não tenha proporcionado ganhos em relação à testemunha, deve-se ressaltar que, considerando o manejo do mofo branco do feijoeiro, permitir o aumento do inóculo para os cultivos subseqüentes, afeta a



sustentabilidade do sistema de produção em curto prazo (Huang *et al.*, 2000; Napoleão *et al.*, 2005). Nesse contexto, o biocontrole de *S. sclerotiorum* tem grande importância, pois conforme demonstrado, ele atua diretamente na redução do inóculo inicial de *S. sclerotiorum*. Portanto, as espécies de *Trichoderma* podem além de proporcionarem o controle do mofo branco, inibir a formação de novos escleródios na área (Abdullah *et al.*, 2008).

## CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstraram que CEN287 e CEN316 proporcionaram as maiores inibições do crescimento do patógeno nos testes com metabólitos não voláteis. Uma aplicação de *T. harzianum* (CEN287, CEN316 e isolado comercial) aos 40 DAS foi capaz de reduzir entre 46-73% o número de apotécios/m<sup>2</sup> (aos 62 DAS) e entre 73-96% o percentual de área coberta por mofo branco do feijoeiro (aos 72 DAS), ocasionando melhor controle da doença nas safras de 2009 e 2010. CEN287 e o isolado comercial foram os únicos que proporcionaram aumento significativo de produtividade de grãos de 2009 para 2010, evidenciando o efeito destes dois isolados no controle do mofo branco do feijoeiro, quando da reprodutibilidade do controle no ano seguinte, onde houve maior pressão da doença.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por uma bolsa de doutorado.

## REFERÊNCIAS

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

AGRIOS, G. N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2005.

ALMEIDA, F.B.R.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.N.; ULHOA, C.J.; LIMA, A.L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1189-1193, 2007.

- ANDREWS, J. H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C. L.; LINDON, S. E. **Biological Control on the Phylloplane**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p. 31-44.
- ÁVILA, Z. R.; CARVALHO, S. S.; BRAÚNA, L. M.; GOMES, D. M. P. A.; SILVA, M. C. F.; MELLO, S. C. M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsi* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos. 2005. (**Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa**, 177), 30 p.
- BAE, Y.S.; KNUDSEN, G.R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 21-24, 2007.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.
- CARVALHO, D.D.C.; OLIVEIRA, T.A.S.; BRAÚNA, L.M.; MELLO, S.C.M. Isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *Fusarium oxysporum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 5 p. (**Comunicado Técnico**, 178).
- CELAR, F. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. **Biological Control**, v. 28, p. 19-24, 2003.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539 p.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v. 57, p. 363-369, 1971.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 337-359, 2005.
- GERLAGH, M.; GOOSSEN-VAN de GEIJN, H.M.; FOKKEMA, N.J.; VEREIJKEN, P.F.G. Long-term biosanitation by application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*-infected crops. **Phytopathology**, v. 89, p. 141-147, 1999.
- GHISALBERTI, E.L., SIVASITHAMPARAM, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biology & Biochemistry** 23, 1011-1020.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.43-56, 2004.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p. 4-10, 2003.

HUANG, H.C.; BREMER, E.; HYNES, R.K.; ERICKSON, R.S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 18, p. 270-276, 2000.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 757-763, 1996.

KAMILOVA, F.; LEVEAU, J.H.J.; LUGTENBERG, B. *Collimonas fungivorans*, an unpredicted *in vitro* but efficient *in vivo* biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1597-1603, 2007.

KOLOMBET, L. V.; ZHIGLETSOVA, S. K.; KOSAREVA, N. I.; BYSTROVA, E. V.; DERBYSHEV, V. V.; KRASNOVA, S. P.; SCHISLER, D. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 123-131, 2008.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 01-07, 1998.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295, 1996.

MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 181-191, 2006.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. p. 7-14. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**, Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p.

MORETINI, A.; MELO, I. S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p.155-161, fev. 2007

NAPOLEÃO, R.; CAFÉ-FILHO, A.C.; NASSER, L.C.B.; LOPES, C.A.; SILVA, H.R. Intensidade do mofo-branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 374-379, 2005.

NASEBY, D.C., PASCUAL, J.A., LYNCH, J.M. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 161–169.

OLIVEIRA, T.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. Avaliação da atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* sp. para biocontrole de *Sclerotinia*

*sclerotiorum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 7 p. (Comunicado Técnico, 177).

PARISI, J.J.D.; PATRÍCIO, F.R.A.; OLIVEIRA, S.H.F. Método do rolo de papel toalha modificado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 288-290, 2006.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R.R.; CARNEIRO, J.E.S.; ANDRADE, M.J.B.; REZENDE, A.M. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009. EPAMIG-CTZM, Viçosa, 2008. 180p.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, v. 69, p. 875-880, 1979.

SAMUELS, G.J.; CHAVERRI, P.; FARR, D.F.; MCCRAY, E.B. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved December 11, 2009, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>

SANTOS, A.B.; FAGERIA, N.K. Manejo do nitrogênio para eficiência de uso por cultivares de feijoeiro em várzea tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1237-1248, 2007.

SORATTO, R.P.; CARVALHO, M.A.C.; ARF, O. Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro em razão da adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 895-901, 2004.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

WANG, L.; VINCELLI, P. *Coniothyrium minitans* on apothecia of *Sclerotinia trifoliorum*. **Plant Disease**, v. 81, p. 695, 1997.

## **CAPÍTULO 3**

**Controle biológico da murcha de fusário do feijoeiro comum com *Trichoderma harzianum***

**(Versão modificada para submissão ao periódico *Journal of Phytopathology*)**

## RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o antagonismo *in vitro* de cinco isolados de *Trichoderma harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, seu efeito no controle do patógeno em sementes e da murcha de fusário do feijoeiro comum em campo. Os isolados foram inicialmente estudados quanto à antibiose e confrontados *in vitro* com o patógeno em testes de cultura pareada a 25°C, das quais foram utilizadas amostras para observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Sementes sadias e artificialmente contaminadas pelo patógeno foram microbiolizadas com 2 mL de suspensões dos antagonistas ( $2,5 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) para cada 100 g de sementes, em rolo de papel germtest a 20 e 25°C. Os percentuais de incidência do patógeno e de plântulas normais foram avaliados aos sete e nove dias, respectivamente. Em campo, os isolados foram aplicados nos sulcos de plantio na dosagem de  $1,2 \times 10^{12}$  conídios ha<sup>-1</sup>, em parcelas de 1m<sup>2</sup> infestadas com o patógeno e cultivadas com a cv. BRS Valente, em duas safras (2009/2010 e 2010). Os experimentos foram conduzidos em blocos distribuídos ao acaso (DBC), com quatro repetições para cada tratamento. Aos 64-67 dias após a semeadura (DAS), avaliaram-se incidência e severidade da murcha de fusário e, aos 85 DAS, realizou-se a colheita. Amostras de solo foram coletadas no momento da colheita, para quantificação das densidades de inóculo do patógeno e do antagonista remanescentes no solo. Todos os isolados apresentaram antagonismo *in vitro* contra o patógeno. Entretanto, de acordo com as imagens de MEV, apenas CEN287 exerceu hiperparasitismo sobre o patógeno. Os isolados CEN287 e CEN316 foram superiores aos outros isolados e à testemunha no controle de *F. oxysporum* em sementes, reduzindo em 40 e 31% a incidência do patógeno, respectivamente. Exceto CEN289, todos os isolados reduziram a incidência e a severidade da murcha na safra de 2009/2010. Já na safra 2010, quando houve maior pressão de doença, apenas CEN287 e CEN316 apresentaram índices de murcha (24,3% e 20,9%, respectivamente) similares aos tratamentos sem infestação pelo patógeno (14,6%) e inferiores à testemunha (40,3%). Verificou-se correlação negativa entre os números de propágulos de *F. oxysporum* e de *Trichoderma* g<sup>-1</sup>, em amostras obtidas dos tratamentos, nas duas safras. CEN287 foi o isolado que melhor sobreviveu no solo, reduzindo drasticamente a população do patógeno.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*, patologia de sementes, patógeno habitante do solo, murcha vascular.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antagonism of five isolates of *Trichoderma harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 and CEN316) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, its effect to control the pathogen on infected seeds and the *Fusarium* yellows wilt of common bean under field conditions. Initially, the isolates were evaluated *in vitro* against the pathogen in paired cultures at 25°C, from which samples were used for scanning electron microscopy (SEM). Healthy and infected seeds were treated with 2 mL of antagonist suspensions ( $2.5 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup>) for each 100g seeds, in *germtest* paper, at 20 and 25°C. Pathogen incidence (%) and normal seedlings were evaluated at seven and nine days, respectively. In field assays, isolates were applied into the furrows at  $1.2 \times 10^{12}$  conidia ha<sup>-1</sup> (microplots of 1m<sup>2</sup>) infested with the pathogen, and common bean, cv. 'BRS Valente' was grown in two corps (2009/2010 and 2010). The experiments were carried out in randomized block design, with four replicates. At 64-67 days after seeding (DAS), *Fusarium* yellows wilt (incidence and severity) was evaluated, and harvest was performed with 85 DAS. Sample soils were collected at the harvest aiming to quantify remaining pathogen and antagonist populations. The isolates presented *in vitro* antagonism against the pathogen. However, according to SEM images, only CEN287 shown parasitism on the pathogen. CEN287 and CEN316 were superior to the other treatments in the control of *F. oxysporum* in the seeds, reducing 40 and 31% the incidence, respectively. Excepting CEN289, all isolates reduced the *Fusarium* yellows wilt incidence and severity in the 2009/2010 season. Concerning 2010, when there was greater disease pressure, only CEN287 and CEN316 presented wilt index (24.30% and 20.96%, respectively) similar to the treatment without infestation by the pathogen (14.65%) and inferior to the control (40.36%). Negative correlation between *F. oxysporum* and *Trichoderma* g<sup>-1</sup> populations were verified, from treatment samples, in the two seasons. The isolate that survived better in soil was CEN287, causing significantly reduction the pathogen population.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, seeds pathology, soilborne plant pathogen, vascular wilt.

## INTRODUÇÃO

A murcha ou amarelecimento de fusário do feijoeiro, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* J.B. Kendr. & W.C. Snyder, é uma das doenças mais severas do feijoeiro comum no Brasil (Paula Júnior *et al.*, 2008). O amarelecimento e murcha irreversível de plantas causadas pelo patógeno ocorrem geralmente durante a fase de enchimento de vagens, causando a morte das plantas afetadas. Apesar da escassez de dados disponíveis sobre perdas no rendimento, sabe-se que os danos provocados por esta doença são muito variáveis, podendo afetar desde algumas plantas até 80% da lavoura (Sartorato & Rava, 1994).

Segundo Sartorato & Rava (1994), sementes contaminadas estão entre os principais meios de disseminação do patógeno. Após sua introdução em áreas cultivadas, a murcha de fusário inicia-se em pequenas reboleiras e, após alguns anos de cultivo, pode disseminar-se por toda área (Abawi & Pastor-Corrales, 1990). O patógeno sobrevive no solo na forma de clamidósporos, os quais são infectivos ao feijoeiro comum (Cândida *et al.*, 2009).

O controle da murcha de fusário em cultivares suscetíveis é extremamente difícil e existem poucas estratégias de manejo recomendadas para esta doença (Hall & Nasser, 1996). Os fungicidas químicos não são utilizados para manejo de murchas vasculares (exceto no tratamento de sementes) por não conseguirem impedir a infecção das plantas, a partir das raízes, e colonização do floema das plantas pelo patógeno. O controle biológico, por sua vez, pode ser inserido no manejo da murcha de fusário pelo seu potencial de redução do inóculo inicial do patógeno e, como consequência, reduzir a incidência da doença no campo.

Fungos do gênero *Trichoderma* têm apresentado resultados promissores no controle de diversas doenças do feijoeiro comum (Carvalho *et al.*, 2011). A competição com os patógenos, parasitismo direto e a produção de compostos antifúngicos estão entre os mais importantes mecanismos exercidos por esses agentes de biocontrole (Alabouvette *et al.*, 2009). Populações de *Trichoderma* spp. podem se estabelecer em diferentes tipos de solo, colonizar e se reproduzir na rizosfera, alcançando níveis detectáveis ao final de um ciclo de cultivo (John *et al.*, 2010; Mohamed & Haggag, 2006). Portanto, é possível que isolados competitivos de espécies de *Trichoderma* possam controlar a murcha de fusário, e reduzir as perdas causadas por esta doença.

Durante as últimas décadas, vários potenciais agentes de biocontrole foram caracterizados e comercializados no mundo (Shali *et al.*, 2010). No Brasil, a área tratada



com *Trichoderma* cresceu significativamente nos últimos anos, e sua viabilidade como medida de controle de doenças junto a questões relacionadas a problemas ambientais constituem em fortes razões para a atual expansão do mercado de agentes de controle biológico no país (Morandi & Bettiol, 2009). O tratamento de sementes com agentes de biocontrole é capaz de diminuir a transmissão de doenças via sementes, razão pela qual, a adoção de tal prática vem aumentando em diversas culturas (Corrêa *et al.*, 2008).

Tais benefícios são alcançados por isolados de antagonistas que passaram por testes sistematicos de seleção antes de sua aplicação em campo, como medida de controle de doenças. Todavia, há poucos relatos de biocontrole de murchas causadas por *F. oxysporum* em diversas culturas e, aparentemente, a eficiência de *Trichoderma* spp. no controle biológico da murcha de fusário do feijoeiro comum, em campo, ainda não foi demonstrada. Assim, este trabalho objetivou avaliar o antagonismo de cinco isolados de *Trichoderma harzianum* previamente selecionados contra outros patógenos habitantes do solo que atacam a cultura do feijoeiro (Oliveira *et al.*, 2008), em testes *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e seu efeito no controle do patógeno em sementes e na supressão da murcha de fusário, em condições de campo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolados de *Trichoderma harzianum* e *Fusarium oxysporum***

Os isolados CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316 de *T. harzianum* foram obtidos da Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF), onde foram realizados os testes *in vitro*. Também desta coleção, foi utilizado o isolado C-25-02 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, enquanto o outro isolado do patógeno, Fop-46, pertence à coleção de microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil).

### **Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* em cultura pareada**

Para verificação do antagonismo dos isolados de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, utilizou-se adaptação do método de cultura pareada descrito por Dennis & Webster (1971), no qual o patógeno foi repicado três dias antes do antagonista. Discos de ágar (5 mm de diâmetro) retirados de colônias de *F. oxysporum* (C-25-02) com cinco dias de cultivo foram transferidos para placa de Petri contendo BDA e, decorridos os três dias,

foi posicionando opostamente, em cada placa, um disco de cultura do antagonista. As placas foram mantidas em BOD a 25° C com fotoperíodo de 12 horas. Aos cinco dias após repicagem dos isolados do antagonista, foram realizadas medições do diâmetro das colônias do patógeno e, aos nove dias, a classificação do antagonismo, de acordo com escala descrita por Bell *et al.* (1982). O experimento foi conduzido com quatro repetições, para cada isolado de *Trichoderma*.

### **Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *T. harzianum* sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli***

Após três dias de crescimento de *F. oxysporum* (C-25-02) em BDA a 25° C e fotoperíodo de 12 h, bases de outras placas de Petri de tamanho correspondente, contendo meio BDA solidificado, receberam no seu centro um disco de ágar contendo micélio dos antagonistas. As bases das placas contendo o antagonista recém colocado e o patógeno (com três dias de crescimento) foram sobrepostas e unidas com filme plástico transparente. As placas foram mantidas nas condições mencionadas, de forma que as bases superiores fossem aquelas que continham o patógeno. Após cinco dias, quando a colônia testemunha (base correspondente ao antagonista contendo apenas BDA solidificado) encontrava-se totalmente colonizada, mediu-se o diâmetro das colônias de *F. oxysporum*. Os valores médios de percentagens de inibição pelos metabólitos voláteis (mv) foram obtidos em relação ao crescimento da testemunha. Considerou-se 100% de crescimento a área final ocupada pela testemunha menos a área inicial (patógeno com três dias de crescimento). Para verificar a ação de metabólitos não voláteis (mnv), filtrados das culturas de *Trichoderma* foram incorporados ao meio, conforme descrito por Mello *et al.* (2007). Cinco discos (5 mm) contendo micélio de *T. harzianum* foram transferidos para frascos Erlenmeyer (500 mL), contendo 250 mL de meio BD (batata-dextrose). Após cinco dias de cultivo em agitador orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160) a 250 rpm e temperatura de 25° C, em ausência de luz, as culturas foram filtradas, com auxílio de bomba a vácuo. Cada isolado passou por três filtrações, com 1, 2 e 3 papéis de filtro, respectivamente. A parte líquida foi esterilizada por filtração (filtro Millipore 0,45µm). Cinco mililitros do filtrado de cada isolado foi acrescido a 15 mL de BDA fundente contendo ágar a 28%, em placa de Petri. Após solidificação do meio, um disco de ágar (5 mm), contendo micélio do patógeno (C-25-02), foi depositado sobre o meio. Para a testemunha, adicionaram-se 5 mL de água destilada esterilizada ao BDA fundente. As placas foram mantidas a 25° C e fotoperíodo de 12 h, até

completa colonização do meio pelo patógeno nas placas testemunhas. Tomaram-se, então, as medidas de diâmetro das colônias do patógeno. Os valores obtidos foram convertidos em porcentagem, da mesma forma que no item anterior. Os experimentos com mv e mnv foram conduzidos por duas vezes, em DIC, com quatro repetições para cada isolado de *Trichoderma*.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Para estudo da interação entre isolados de *T. harzianum* e *F. oxysporum* (C-25-02), pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram utilizadas amostras provenientes do pareamento de culturas realizado. Assim, discos de BDA (5 mm) provenientes de áreas do confronto entre as colônias de *T. harzianum* e *F. oxysporum* foram removidos e submetidos ao procedimento descrito por Bossola & Russel (1998). Tal procedimento consistiu no tratamento das amostras com solução fixadora (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M a pH 7,2) para fixação a 4° C durante 24 horas, seguido de 4 lavagens com tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,2) e pós-fixados durante 1 hora a 4° C com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% em tampão cacodilato 0,01 M (pH 7,2). Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com água destilada, e desidratadas em gradiente crescente de álcool etílico (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%). Para secagem ao ponto crítico, utilizou-se dióxido de carbono no secador Elmitech Critical Point Drayer K850. As amostras foram montadas sobre “stubs” de alumínio e metalizadas com ouro (20 nm) em evaporador de ouro Elmitech k 550. As visualizações foram realizadas ao microscópio eletrônico ZEISS® DSM 962. Todas as repetições de pareamento de culturas representativas dos cinco isolados do antagonista foram incluídas neste estudo.

### **Multiplicação de *Trichoderma harzianum* para testes *in vivo***

Na Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, GO), foram preparadas as suspensões de conídios para tratamento de sementes dos experimentos conduzidos no Laboratório de Qualidade de Sementes, e na aplicação em sulcos de plantio dos experimentos de campo. Discos de ágar contendo micélio dos isolados de *T. harzianum* foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL), contendo grãos de arroz parboilizado (15 g frasco<sup>-1</sup>), previamente umedecido (60% p v<sup>-1</sup>) e autoclavado. Os frascos foram mantidos em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas durante seis dias. Após esse período, adicionou-se água destilada esterilizada aos frascos para, em seguida, recolher os esporos,

que foram filtrados em gaze esterilizada. A concentração de conídios obtida em ambos os ensaios foi ajustada, de acordo com a concentração exigida para cada tipo de teste, em câmara de Neubauer.

### **Infecção de sementes com *Fusarium oxysporum***

Para obtenção de sementes contaminadas pelo isolado FOP 46 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, empregou-se a técnica de restrição hídrica utilizando-se meio BDA + Manitol a - 1,0 MPa (Costa *et al.*, 2003). Após seis dias de cultivo do patógeno em placas de Petri de 15 cm de diâmetro a 25° C (seis discos placa<sup>-1</sup>), obteve-se a colonização total das placas, que em seguida foram cobertas com sementes de feijão ‘BRS Valente’ desinfestadas previamente em hipoclorito de sódio a 1% por 1 min. Em seguida, as sementes foram lavadas por duas vezes (1 min) em água destilada esterilizada e submetidas a secagem em câmara de fluxo laminar durante 20 min, em camada única. As placas colonizadas com o patógenos, após receberem as sementes, foram incubadas por mais cinco dias a 25° C.

### **Teste para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes tratadas com *Trichoderma harzianum***

As sementes artificialmente contamiadas foram tratadas com os isolados de *T. harzianum* e isolado comercial de *T. harzianum* ‘1306’ (Trichodermil® SC) a 2 mL de suspensão a  $2,5 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> para cada 100 g de sementes. Em seguida, 50 sementes foram distribuídas uniformemente sobre duas folhas de papel *germtest* (44,0 x 34,0 cm), umedecidas com água destilada e cobertas com uma terceira folha umedecida (Regras para Análise de Sementes, 2009). Os rolos de papel obtidos foram colocados dentro de saco plástico preto (4 rolos do mesmo tratamento saco<sup>-1</sup>) e encaminhados para sala de incubação a 20° C e umidade relativa de 98%, onde permaneceram pelo período de sete dias. Os tratamentos foram avaliados por meio da incidência de micélio aéreo de *F. oxysporum* ao redor das sementes e plântulas infectadas por meio de observação em microscópio estereoscópio Zeiss Stemi DV4, além de monofiálides, microconídios e macroconídios típicos de *F. oxysporum*, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (2009). A confirmação da espécie do patógeno, quando necessária, foi realizada pela confecção de lâminas microscópicas semi-permanentes e análise destas em microscópio ótico Nikon Eclipse 55i. O experimento foi conduzido duas vezes em DIC, e cada tratamento contou com quatro repetições de 50 sementes dispostas em rolo de papel *germtest*. Como controles,

empregaram-se sementes tratadas com fungicida químico Carboxin+Thiram a 300 mL 100 kg<sup>-1</sup> sementes (200 g L<sup>-1</sup> de carboxina; 200 g L<sup>-1</sup> de thiram) e sementes não tratadas, respectivamente.

### **Testes de germinação e vigor**

Os testes de germinação e vigor de sementes, com os mesmos tratamentos empregados nos testes de sanidade, foram conduzidos duas vezes em DIC, e contaram com quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Os rolos foram levados para germinador De Leo à temperatura de 25°C, onde permaneceram por nove dias para avaliação da germinação das sementes. Na avaliação de vigor das sementes, foram estimadas as porcentagens de plântulas normais, segundo as regras para análise de sementes (Regras para Análise de Sementes, 2009).

### **Efeito de isolados de *Trichoderma* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em cultivar suscetível, em microparcels.**

Os experimentos de campo foram conduzidos durante as safras de 2009/2010 (verão) e 2010 (inverno) em microparcels experimentais de 1m x 1m (com duas linhas de plantio de 1m de comprimento), na Embrapa Arroz e Feijão. Antes do plantio do primeiro experimento (dezembro de 2009 a março de 2010), as microparcels foram infestadas pelo isolado FOP 46 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* através de quatro inoculações consecutivas (14/11/09, 27/11/09, 12/12/09 e 19/12/09) de inóculo produzido em meio líquido Tochinai (10 g de Peptona bacteriológica; 0,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 20 g de Maltose; 1000 mL de água destilada). Para tanto, discos de micélio contendo FOP 46 foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade (4 discos/frasco) e mantidos em mesa agitadora orbital (marca G10 Gyrotory<sup>®</sup> Shaker, New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, N.J., USA) a 120 rpm sob temperatura ambiente durante quatro dias. As aplicações do inóculo ocorreram, aproximadamente, de 12 em 12 dias até a data do semeio, com 300 mL/microparcels de suspensão calibrada a 1,3 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, com auxílio de pulverizador de compressão manual prévia (marca Guarany, modelo 417-02) com 3,8 L de capacidade. A última das quatro primeiras aplicações coincidiu com a semeadura do primeiro experimento e foi dirigida aos sulcos de plantio abertos manualmente, os quais receberam 15 sementes metro linear<sup>-1</sup> da cultivar BRS Valente (ciclo 80-92 dias). Logo após o semeio, os sulcos foram pulverizados com suspensão de conídios dos isolados de *T.*

*harzianum*, na dosagem ajustada de  $1,2 \times 10^{12}$  conídios  $\text{ha}^{-1}$ . Os sulcos foram imediatamente fechados com solo objetivando minimizar exposição dos microrganismos aplicados ao sol. As microparcels foram irrigadas logo em seguida. Os sulcos foram adubados com NPK e as demais práticas culturais conduzidas em conformidade com Paula Júnior *et al.* (2008). Aos 20 dias após o semeio (DAS) foi realizada uma quinta infestação do patógeno (08/01/10), desta vez com a incorporação cuidadosa do inóculo preparado em AFA (Areia:Fubá:Água – 9:1:2). Para tanto, uma massa correspondente a 100 g de meio AFA foi diluída em 500 mL de água destilada, originando a suspensão contendo conídios e clamidósporos de FOP 46 a  $1,5 \times 10^6$  propágulos  $\text{mL}^{-1}$  com 15-20 dias de cultivo, a qual foi aplicada em cada microparcela, almejando reforçar as infestações. Igual procedimento foi adotado para a condução do segundo experimento (abril a julho de 2010), no qual foram aplicados 300 mL microparcela<sup>-1</sup> de suspensão do patógeno calibrada a  $1,3 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  apenas no momento do plantio (22/04/10). Além disso, aos 20 DAS do segundo experimento (20/05/10), houve a incorporação do meio AFA no solo das microparcels, conforme especificado anteriormente. Além das coletas de solo nos dias das infestações, constaram mais três coletas de solo (03/02/10, 16/03/10 e 16/07/10), para acompanhamento da evolução da população do patógeno.

O ensaio foi instalado em blocos casualizados, com quatro repetições de  $1 \text{ m}^2$ . Como controles, foram utilizados uma testemunha absoluta (sem aplicação de *Trichoderma*), a cepa comercial '1306' de *T. harzianum*, aplicada nas mesmas concentrações dos isolados de *T. harzianum* avaliados e sementes tratadas com fungicida químico Carboxin+Thiram a 300 mL  $100 \text{ kg}^{-1}$  sementes ( $200 \text{ g L}^{-1}$  de carboxina;  $200 \text{ g L}^{-1}$  de Tiram). As irrigações durante o primeiro experimento (safra 2009/2010 – verão) foram realizadas quando necessárias, enquanto que para o plantio seguinte (safra 2010 – inverno), foram feitas diariamente.

#### **Estimativa da densidade de inóculo de *Trichoderma* e *Fusarium oxysporum* no solo**

A estimativa da densidade de inóculo de *F. oxysporum* (no decorrer das infestações) e de *Trichoderma* (no momento da colheita de cada safra) foi realizada mediante emprego dos meios seletivos Komada (20,0 g de D-Galactose; 2,0 g de L-Asparagina; 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de KCl; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg de  $\text{Fe}_3\text{Na EDTA}$ ; 18,0 g de ágar; 750 mg de PCNB; 1,0 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ; 1000 mL de água destilada) e TSM (*Trichoderma selective medium*) (0,12 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,26 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,26 g de  $\text{KNO}_3$ ; 1,0 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 0,05 g de ácido cítrico; 1,0 mL de Igepal; 2,0 g de

Sacarose; 18,0 g de ágar; 0,0025 g de Vinclozolin; 1000 mL de água destilada), respectivamente. Amostras compostas foram coletadas na linha da semeadura das microparcelsas, a 0-10 cm de profundidade. A população total de *F. oxysporum* foi estimada pela diluição de 10 g de solo em água esterilizada até a razão 1:100. Alíquotas de 1 mL da suspensão do solo (1:100) foram plaqueadas nos meios Komada e TSM, empregando-se cinco repetições por tratamento. A estimativa do número de propágulos de *F. oxysporum* e *Trichoderma* por grama de solo foi obtida pela fórmula: NP = NC x 90, sendo NP (número de propágulos por grama de solo) e NC (número médio de colônias por placa). Para estimar a relação entre populações de *F. oxysporum* e de *Trichoderma*, não foi incluído o controle (microparcelsas livres de *F. oxysporum* e sem aplicação de *Trichoderma*).

### **Avaliações em campo da murcha de fusário**

Transcorridos 64-67 DAS, avaliou-se a severidade da doença, empregando-se a escala de notas descrita por Abawi & Pastor-Corrales (1990), com notas de 1 a 9 (nota 1 - corresponde a plantas sem sintomas perceptíveis; nota 3 - atribuída a plantas com algumas folhas murchas, representando não mais que 10% da folhagem, com pequenas lesões no hipocótilo; nota 5 - atribuída a plantas com aproximadamente 25% das folhas com sintomas de murcha e clorose; nota 7 - cerca de 50% das folhas exibindo sintomas de murcha, clorose e necroses limitadas; nota 9 - plantas com sintomas de necrose com desfolhamento precoce, clorose e murcha em 75% das folhas ou mais, plantas severamente atrofiadas e plantas mortas). As avaliações dos sintomas foram realizadas sempre pela manhã, evitando-se assim, o mascaramento dos sintomas de murcha. Para as análises estatísticas, calculou-se o índice de doença, separadamente, para cada microparcela, de acordo com a fórmula de McKinney (1923):

$$\text{Índice de doença} = \frac{\sum (\text{nota atribuída} \times \text{frequência}) \times 100}{(\text{n}^\circ \text{ de plantas da microparcela} \times 9)}$$

A colheita foi realizada aos 85 DAS, colhendo-se manualmente todas as plantas das microparcelsas. As plantas colhidas foram submetidas à trilhagem manual, para a determinação da produtividade. Separadamente, coletou-se 10 plantas de cada microparcela

para estimativa do número de grãos por vagem e massa de 100 grãos. Em 2010, foram mantidas as mesmas datas para avaliação da doença e de colheita.

### Análises estatísticas

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Realizou-se também a análise de regressão entre todas as variáveis, com auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* em cultura pareada

Os valores médios de crescimento das colônias de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* no 5º dia de cultivo pareado e as médias de notas do antagonismo no 9º dia foram similares para todos os isolados de *T. harzianum* (Tabela 1). Pela classificação, segundo a escala de Bell *et al.* (1982), as médias das notas dos isolados ficaram por volta de 2, tendo estes ocupado pelo menos 70% da superfície do meio.

**Tabela 1** – Crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* no 5º dia de cultivo pareado com isolados de *Trichoderma harzianum* e classificação dos isolados quanto ao antagonismo, segundo escala de Bell *et al.* (1982)<sup>1</sup> com 9 dias de cultivo pareado<sup>(1)</sup>.

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Diâmetro médio das colônias de <i>F. oxysporum</i> (mm) ao 5º dia	Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> aos 9 dias <sup>(2)</sup>
CEN287	43,3	2,0
CEN288	41,0	2,0
CEN289	40,3	2,0
CEN290	42,0	2,0
CEN316	41,3	2,3
Coeficiente de variação	2,99%	12,49%

<sup>(1)</sup>Valores não foram significativos segundo análise de variância ( $P \leq 0,05$ ). <sup>(2)</sup>Classe 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Classe 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

A redução do crescimento de *F. oxysporum* em cultura pareada observada na Tabela 1 possui como causas principais a competição por espaço e por nutrientes, o micoparasitismo e a antibiose (Alabouvette *et al.*, 2009). No presente estudo, atenção a estes



dois últimos mecanismos de ação, em particular, foi dispensada, almejando verificar a capacidade antagônica pela ação direta sobre o patógeno

### **Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *T. harzianum* sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli***

Quanto à produção de mv, exceto CEN290, todos os demais isolados de *T. harzianum* exibiram ação antifúngica e não diferiram entre si (Tabela 2). Os valores médios de porcentagem de inibição verificaram-se entre 23 e 40%.

**Tabela 2** – Efeito inibidor de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

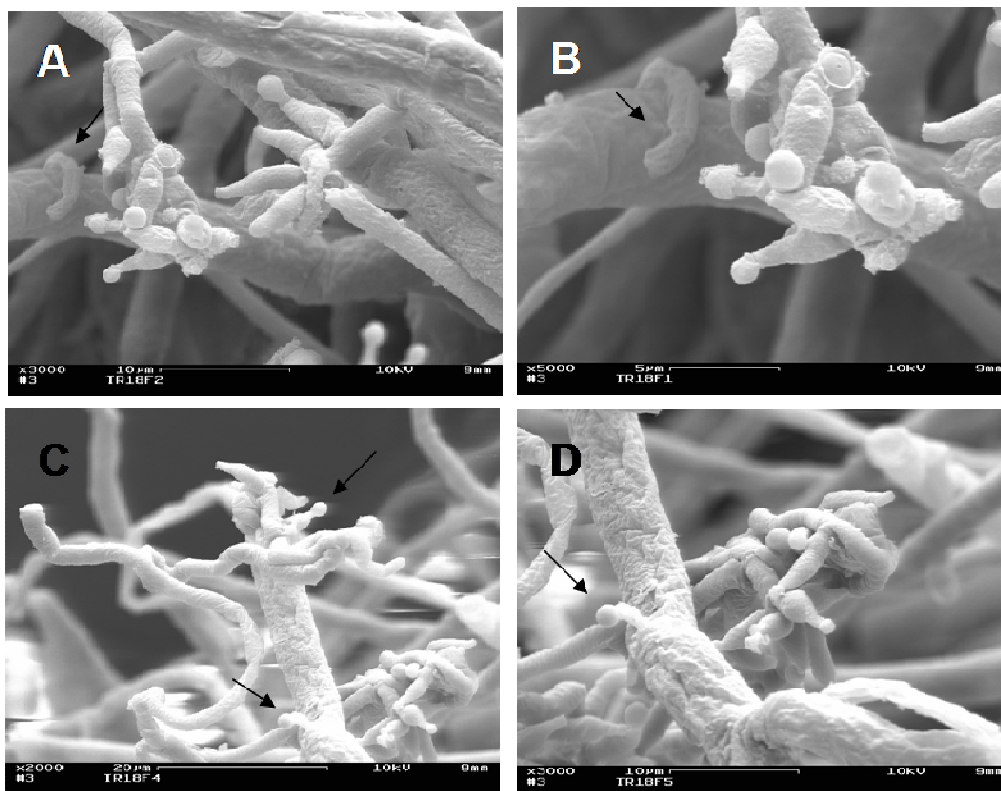
Isolado de <i>T. harzianum</i>	Crescimento de colônias de <i>F. oxysporum</i> sob o efeito de metabólitos de <i>T. harzianum</i> (%) <sup>(1)</sup>	
	Metabólitos voláteis (%) <sup>(2)</sup>	Metabólitos não voláteis (%) <sup>(2)</sup>
CEN287	64,6 aA	96,4 bB
CEN288	60,6 aA	89,9 bB
CEN289	73,2 aA	80,1 aA
CEN290	100,0 bA	95,2 bA
CEN316	77,6 aA	74,2 aA
Testemunha <sup>(3)</sup>	100,0 bA	100,0 bA
Média	75,2 A	87,2 B
Coefficiente de variação	19,84%	11,90%

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). <sup>(2)</sup>Valores relativos a Testemunha, obtidos de colônias com 5 e 9 dias de crescimento, para os ensaios com metabólitos voláteis e não voláteis, respectivamente. <sup>(3)</sup>Metabólitos voláteis: sem adição de disco do antagonista na placa correspondente; Metabólitos não voláteis: adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada ao BDA fundente das placas.

Quando avaliados os mnv, os isolados CEN316 e CEN289 se destacaram dos demais, inibindo o crescimento do patógeno em 20 e 26%, respectivamente. Outro resultado importante para estes dois isolados é a diferença não significativa entre o crescimento do patógeno na presença de mv e mnv. A antibiose, seja por mv ou mnv, também desempenha um importante papel no controle biológico, podendo atuar em conjunto com a competição e agir sinergisticamente com o micoparasitismo, resultando em um maior nível de antagonismo (Lorito *et al.*, 1994). Neste estudo em particular, obtiveram-se melhores resultados de inibição pelos mv. É importante ressaltar que os mv possuem vantagens sobre os mnv, pois possuem maior capacidade de difusão em solo, quando solúveis em água (Lobo Júnior & Abreu, 2000).

### Microscopia eletrônica de varredura

Imagens de MEV mostraram colonização de *T. harzianum* (CEN287) sobre o patógeno, o qual foi envolvido pelas hifas do antagonista (Figuras 1A e 1B). Conídios do isolado CEN287 foram observados sobre hifas de *F. oxysporum* (Figuras 1C e 1D). Os dois tipos de interações verificados podem ser considerados como hiperparasitismo (Agrios, 2005).



**Figura 1** – Microscopia eletrônica de varredura mostrando interações entre *Trichoderma harzianum* (CEN287) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: **A**) seta mostrando um enrolamento do patógeno pelo antagonista; **B**) enrolamento do patógeno pelo antagonista em maior aumento; **C, D**) Conídios de *Trichoderma* produzidos sobre a hifa de *F. oxysporum*.

Durante as interações micoparasíticas verificadas na Figura 1, segundo Zeilinger & Omann (2007), lectinas da parede celular do fungo hospedeiro (patógeno) podem induzir o envolvimento das hifas do antagonista ao seu redor e, como consequência, colonizar completamente a hifa do patógeno. Segundo Benhamou & Chet (1993), esta colonização

pode se dar também internamente ao patógeno, da mesma forma que foi observado nas Figuras 1C e 1D.

### Teste para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes tratadas com *Trichoderma harzianum* e testes de germinação e vigor

O fungicida Carboxin+Thiram foi o melhor tratamento no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes de feijão, reduzindo em 66% a incidência do patógeno nas sementes, aos sete dias após o tratamento químico e biológico das sementes contaminadas. Embora nenhum dos tratamentos biológicos tenha sido estatisticamente similar ao fungicida químico, os isolados CEN287 e CEN316 foram superiores à testemunha (sementes não tratadas) e aos demais isolados, reduzindo a incidência do patógeno nas sementes em 40 e 31%, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3** - Incidência de *Fusarium oxysporum* em sementes e plântulas de feijão ‘BRS Valente’ tratadas com *Trichoderma harzianum* e o respectivo efeito de cada tratamento sobre a germinação de sementes contaminadas e não contaminadas pelo patógeno<sup>(1)</sup>.

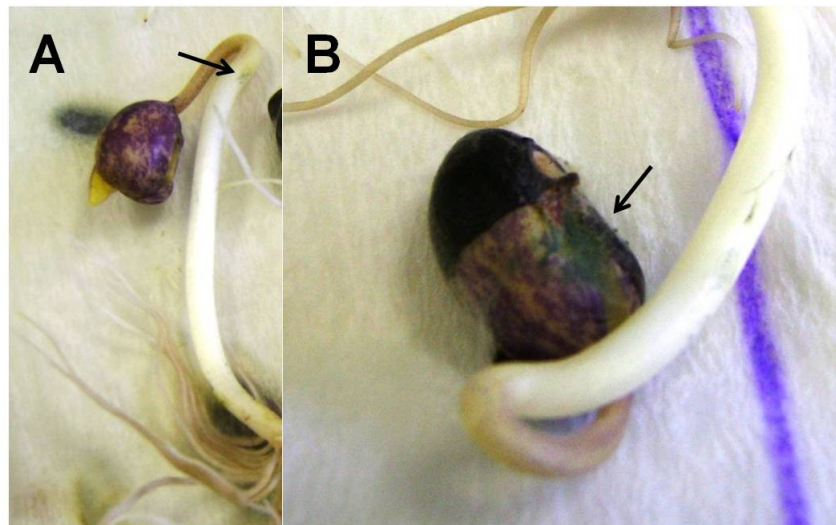
Tratamentos	Germinação (%)		
	Incidência (%) de <i>Fusarium oxysporum</i>	Plântulas normais – sementes contaminadas por <i>F. oxysporum</i>	Plântulas normais – sementes sadias
CEN287	56,0 b	51,5 bA	92,5 B
CEN288	89,5 d	43,5 aA	94,0 B
CEN289	74,0 c	42,0 aA	92,5 B
CEN290	82,0 c	35,0 aA	94,0 B
CEN316	63,5 b	43,5 aA	93,0 B
Isolado comercial	74,5 c	40,5 aA	90,0 B
Carboxin+Thiram	31,5 a	54,0 bA	91,0 B
Testemunha	92,0 d	41,5 aA	93,5 B
Média	-	43,9 A	92,6 B
Coefficiente de Variação	8,22%	13,81%	4,24%

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05).

Aos nove dias de germinação, o isolado CEN287 foi similar ao fungicida Carboxin+Thiram, quanto ao percentual de plântulas normais e superior aos demais isolados de *T. harzianum*. Este resultado evidenciou o maior potencial de emergência e desenvolvimento às plântulas, proporcionado por CEN287, além da persistência do seu efeito antagônico à *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes, dois dias após avaliação da incidência.

O isolado CEN287 foi similar aos demais tratamentos quanto aos efeitos de mv sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, um importante mecanismo de controle biológico de

patógenos em sementes (Agüero *et al.*, 2008). O micoparasitismo (Figura 1) e a habilidade em ocupar agressivamente os sítios de estabelecimento do patógeno nas sementes e plântulas (Figura 2) foram as propriedades responsáveis pelo seu diferencial em relação aos demais isolados, para controlar *F. oxysporum* nas sementes contaminadas. Dessa forma, o mecanismo de escape relatado por Mertz *et al* (2009), em que o patógeno fica limitado ao tegumento que, durante o processo de emergência é deixado no substrato, sem prejuízo sanitário para as plântulas originadas, não pode ser cogitado.



**Figura 2** – *Trichoderma harzianum* (CEN287) colonizando plântulas de feijoeiro cv. BRS Valente e oriundas de sementes contaminadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP 46): **A**) seta mostrando região do hipocótilo colonizado pelo antagonista; **B**) completa colonização dos cotilédones pelo antagonista aplicado às sementes.

O efeito do patógeno sobre as sementes foi demonstrado também pela relação linear inversamente proporcional entre os percentuais de incidência de *F. oxysporum* nas sementes e produção de plântulas normais nas sementes contaminadas pelo patógeno ( $y = -0,2471x + 61,3299$ ;  $R^2 = 64,87\%$ ;  $P \leq 0,01$ )

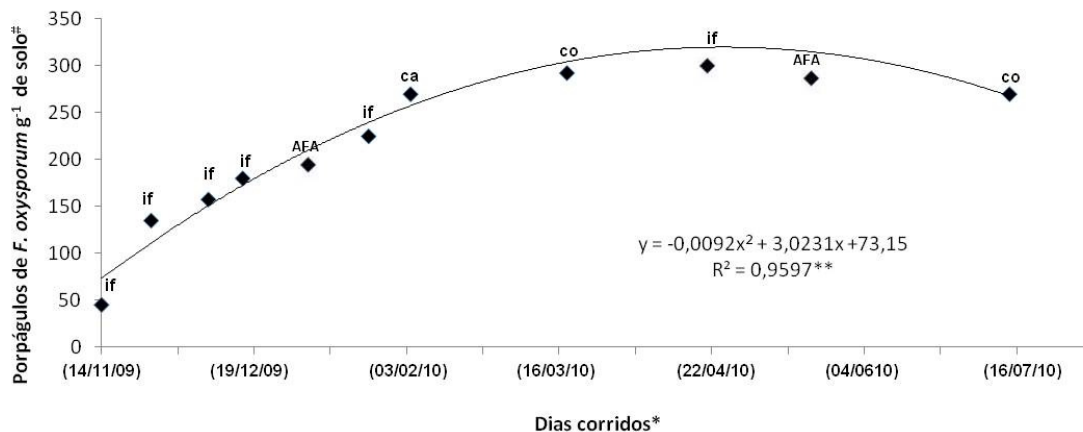
O tratamento com 2 mL de suspensão a  $2,5 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de *T. harzianum* para cada 100 g de sementes sadias de feijoeiro não ocasionou fitotoxidez ou qualquer outro prejuízo à germinação das sementes. As diferenças representadas pelas letras maiúsculas na Tabela 3 evidenciam o quanto as sementes foram afetadas pela presença do patógeno, responsável por reduzir, em média, 52% a germinação de plântulas normais. Os resultados da Tabela 3 mostram a importância do controle biológico de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*,

cuja ocorrência em sementes, mesmo em taxas relativamente baixas, pode introduzir o patógeno em novas áreas e gerar grandes perdas na produção (Costa *et al.*, 2003).

Harman *et al.* (2004) relataram que sementes de milho tratadas com *T. harzianum* (isolado T22) tiveram as radículas das plântulas colonizadas pelo antagonista. Tal característica, observada na Figura 2, está entre as mais desejadas na seleção de um agente para bioproteção de sementes (Harman *et al.*, 2004). Khan *et al.* (2004) aplicaram um isolamento de *T. harzianum* (TO-14) a uma concentração similar ( $2,2 \times 10^8$  conídios/100 g de sementes de grão de bico) ao nosso estudo, objetivando ao controle da murcha em grão de bico, causada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Esses autores verificaram 60% de redução da incidência de murcha nas plantas com 45 dias de cultivo, obtidas de sementes tratadas com *T. harzianum* (TO-14) e 40% de incidência nas plantas obtidas de sementes tratadas com o fungicida carbendazim ( $2 \text{ g kg}^{-1}$  de sementes). Os valores de redução de incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes e plântulas infectadas do presente estudo também foram altos (Tabela 3). O isolado CEN287 reduziu em 40% a incidência, enquanto que a mistura Carboxin+Thiram ( $300 \text{ mL } 100 \text{ kg}^{-1}$  sementes) proporcionou 66% de redução da incidência do patógeno nas plântulas obtidas de sementes tratadas.

#### **Efeito de isolados de *Trichoderma* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em cultivar suscetível, em microparcelas**

As infestações sistematizadas das microparcelas partiram de um número inferior a 50 propágulos de *F. oxysporum*  $\text{g}^{-1}$  de solo (Figura 3), que ocorriam naturalmente, antes da primeira infestação.



**Figura 3** – Relação entre o número de propágulos de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> de solo e o número de dias corridos a cada uma das infestações e coletas de solo das microparcelas experimentais. Santo Antônio de Goiás, GO, 2009/2010 e 2010. Códigos: **if** – infestações com conídios; **AFA** – infestações com conídios e clamidósporos obtidos em meio AFA; **ca** - apenas coleta de solo; **co** - colheita safra 2009/2010; **co** - colheita safra 2010. \*\*Significativo pelo teste F (P≤0,05).

Em se tratando do gênero *Fusarium*, é comum se encontrar densidades de inóculo inferiores a 50 propágulos g<sup>-1</sup> de solo em solos não cultivados com o feijoeiro (Hall & Phillips, 1992). Ainda segundo Hall & Phillips (1992), ao se cultivar anualmente o feijoeiro comum, a população deste fungo pode se elevar a valores da ordem de até 400 propágulos g<sup>-1</sup> de solo. No presente trabalho, após três aplicações da suspensão de conídios do patógeno, a 1,3 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, e descontando a população inicial de *F. oxysporum* no solo, é razoável estimar o inóculo inicial do patógeno em 150 propágulos infectivos de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* g<sup>-1</sup> de solo (Figura 3), quando se procedeu ao plantio da safra 2009/2010.

Todas as parcelas apresentaram plantas amareladas e/ou murchas, nos dois experimentos, em severidade variável. É importante salientar que o aumento do inóculo no solo cultivado com a cv. BRS Valente e a infecção das plantas foram alcançadas sob condições climáticas favoráveis (temperatura média de 24,6° C e irrigação diária) durante o período da safra de 2009/2010, foi suficiente para obtenção de plantas doentes e avaliação aos 64 DAS, durante a fase de enchimento de vagens do feijoeiro comum. Já para a safra de 2010, o plantio de ‘BRS Valente’ foi realizado com uma população do patógeno próxima a 300 propágulos g<sup>-1</sup> de solo (Figura 3), e com temperatura média de 22,8°C durante o ciclo de cultivo, ocorrendo a reprodução da doença mais uma vez (Tabela 4).

**Tabela 4** – Efeito de *Trichoderma harzianum* no controle da murcha de fusarium em feijoeiro comum ‘BRS Valente’ em campo, nas safras de 2009/2010 (verão) e 2010 (inverno). Santo Antônio de Goiás, GO<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Safrá 2009/2010 (verão)		Safrá 2010 (inverno)	
	Incidência (%)	Índice de doença (%) <sup>(2)</sup>	Incidência (%)	Índice de doença (%) <sup>(2)</sup>
CEN287	47,1 aA	20,7 aA	51,3 bA	24,3 aA
CEN288	56,1 aA	26,9 aA	87,8 cB	40,5 bB
CEN289	79,1 bA	32,1 bA	82,2 cA	32,5 bA
CEN290	47,1 aA	22,7 aA	72,0 cB	30,1 bA
CEN316	37,5 aA	20,4 aA	41,2 bA	20,9 aA
Isolado comercial	58,5 aA	25,2 aA	68,0 cA	28,3 bA
Carboxin+Thiram	82,0 bA	32,5 bA	85,8 cA	35,4 bA
Microparcelas não infestadas	27,7 aA	17,5 aA	15,9 aA	14,6 aA
Microparcelas infestadas <sup>(3)</sup>	82,4 bA	36,8 bA	92,8 cA	40,3 bA
Média	57,5 A	26,1 A	66,3 B	29,7 B
Coefficiente de variação	25,88%	20,58%	20,69%	25,28%

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). <sup>(2)</sup>Para as análises estatísticas, calculou-se o índice de doença, separadamente, para cada microparcela, de acordo com a fórmula de McKinney (1923). <sup>(3)</sup> Microparcelas infestadas pelo isolado FOP 46 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, sem aplicação de *Trichoderma* nos sulcos.

Ao se comparar a média geral da incidência e o índice da murcha de fusarium para cada ano agrícola (57,5 e 66,3% de incidência e 26,1 e 29,7% de índice de doença para as safras 2009/2010 e 2010, respectivamente), verifica-se que o aumento do inóculo inicial e as condições ambientais favoreceram o aumento da murcha na safra 2010 (Tabela 4). Segundo Abawi & Pastor-Corrales (1990), quanto mais próximo de 20° C for a temperatura média durante o ciclo de cultivo, maior é a severidade da murcha de fusário.

Todos os tratamentos reduziram a incidência da doença em comparação à testemunha infestada com o patógeno, à exceção de CEN289 e o tratamento com Carboxin+Thiram. A incidência de murcha e o índice de doença em 2009/2010 para os isolados CEN287, CEN288, CEN290, CEN316 e o isolado comercial foram de 47,1 e 20,7%; 56,1 e 26,9%; 47,1 e 22,7%; 37,5 e 20,4%; 58,5 e 25,2%, respectivamente, sendo foram similares às microparcelas não infestadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (27,7 e 17,6%, respectivamente) (Tabela 4).

No segundo cultivo do feijoeiro comum ‘BRS Valente’ (safra 2010), sob maior pressão de inóculo e de doença, nenhum tratamento foi similar às microparcelas não infestadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* quanto à incidência da doença, que teve média de 15,9% (Tabela 4). Apenas CEN287 e CEN316 se destacaram reduzindo a incidência de

doença em 45 e 55%, respectivamente, em comparação com a testemunha infestada com o patógeno e sem antagonistas. Nos demais tratamentos, a incidência da murcha variou entre 68 e 92,8%. Já para o índice de doença, os isolados CEN287 e CEN316 foram similares às microparcels não infestadas com *F. oxysporum* (24,3; 20,9 e 14,6%, respectivamente). Os índices de doença nos demais tratamentos variaram entre 28,3 e 40,5%. As formas de avaliação (incidência e índice de doença) foram complementares, principalmente ao verificar que a distribuição das médias na primeira safra (2009/2010) é idêntica, e quase igual na segunda (2010), à exceção da testemunha não infestada. Foi observada uma relação linear positiva entre a incidência (%) e o índice de doença (%) de cada safra avaliada (safra 2009/2010:  $y=0,3164x + 7,9488$ ,  $R^2= 94,33\%$ ,  $P\leq 0,01$ ; safra 2010:  $y=0,3314x + 7,7172$ ;  $R^2= 94,65\%$ ;  $P\leq 0,05$ ). Segundo Agrios (2005), a incidência tem relação direta com a severidade e adequada para quantificação em doenças sistêmicas, que atacam a planta como um todo.

Os isolados CEN288 e CEN290 não conteram a doença com o aumento do inóculo do patógeno no solo e decréscimo de temperatura, no segundo experimento (Tabela 4). Já os isolados CEN287 e CEN316 foram efetivos tanto no verão quanto no inverno. Esta estabilidade de resultados é considerada como satisfatória e se constitui em evento não muito comum nas pesquisas com agentes de controle biológico de murchas vasculares. Isso ocorre porque o controle biológico não é dependente apenas das interações planta-microrganismos, mas também da adaptabilidade ecológica do agente de biocontrole (Alabouvette *et al.*, 2009).

Dentre os cinco isolados estudados, CEN287 e CEN316 são os únicos que apresentaram capacidade hiperparasítica. Tal capacidade foi evidenciada para CEN287 na Figura 1 do presente trabalho. Inbar *et al* (1996) relataram que a capacidade parasítica *in vitro* de *T. harzianum* foi reproduzida em condições de campo em solo esterilizado. Entretanto, vale salientar que outros mecanismos observados *in vitro* e nos testes com sementes contaminadas podem estar ativos no campo para estes dois isolados.

Verificou-se aumento significativo da média geral da produtividade de grãos em  $\text{kg ha}^{-1}$  de 2009/2010 para 2010. Neste contexto, o isolado comercial de *T. harzianum* e as microparcels não infestadas com *F. oxysporum* foram os únicos que mostraram esta tendência (Tabela 5). A maior pressão de doença verificada na safra 2010 possivelmente contribuiu para que este aumento significativo da produtividade das microparcels em que houve infestação pelo patógeno, não ocorresse. Tal efeito se deve à provável capacidade do



isolado comercial para promover o crescimento de plantas e aumento de produtividade, compensando os efeitos da doença. Esta inferência é válida, pois espécies de *Trichoderma* podem produzir substâncias promotoras do crescimento das plantas (fitohormônios) ou solubilizar nutrientes da rizosfera, com conseqüências na produtividade das culturas (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009; Vinale *et al.*, 2009).

**Tabela 5** – Produtividade de grãos de feijoeiro comum ‘BRS Valente’ e seus componentes, considerando o efeito de *Trichoderma harzianum* no controle da murcha de fusarium nas safras de 2009/2010 (verão) e 2010 (inverno). Santo Antônio de Goiás, GO<sup>(1)</sup>.

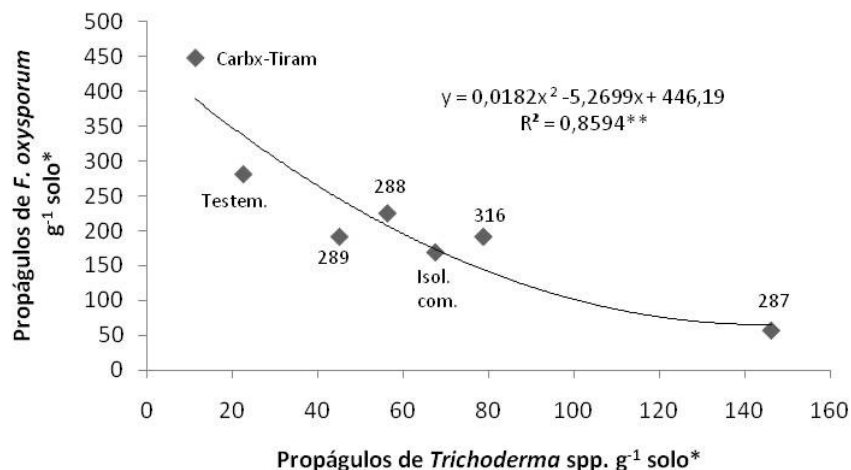
Tratamentos	Grãos (nº por vagem)		Massa de 100 grãos (g)		Produtividade de grãos (kg ha <sup>-1</sup> )	
	2009/2010	2010	2009/2010	2010	2009/2010	2010
CEN287	5,3	5,3	20,6 bA	26,6 B	3664	3832
CEN288	5,0	4,8	19,0 aA	24,5 B	2878	3336
CEN289	5,3	4,8	19,8 aA	25,9 B	3510	3808
CEN290	4,9	5,1	19,2 aA	26,1 B	3494	3948
CEN316	4,9	4,9	19,2 aA	25,5 B	3283	3747
Isolado comercial	5,1	4,6	19,6 aA	25,4 B	3108 A	3848 B
Carboxin+Thiram	5,0	4,7	19,2 aA	23,5 B	2941	3517
Microparcelas não infestadas	4,8	4,5	21,0 bA	25,4 B	3231 A	3855 B
Microparcelas infestadas <sup>(2)</sup>	4,9	4,9	19,6 aA	25,7 B	3110	3418
Média	5,0	4,8	19,7 A	25,4 B	3246 A	3701 B
Coefficiente de variação	8,03%	9,36%	4,93%	5,47%	14,78%	10,89%

<sup>(1)</sup>Valores sem letras não foram significativos segundo análise de variância e, seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05). <sup>(2)</sup>Microparcelas infestadas pelo isolado FOP 46 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, sem aplicação de *Trichoderma* nos sulcos.

Além disso, na safra de 2009/2010, a massa de 100 grãos para o isolado CEN287 e microparcelas não infestadas com *F. oxysporum* (20,6 e 21,0 g) foram superiores em relação aos demais, as quais ficaram entre 19,0 e 19,8 g (Tabela 5). É possível, neste caso, que o isolado CEN287 tenha apresentado efeito promotor do crescimento de plantas, fato não observado no segundo experimento. O aumento generalizado da massa de 100 grãos de 2009/2010 (média geral: 19,7 g) para 2010 (média geral: 25,7 g) ocorreu em todos os tratamentos, e pode ter sido causado por acúmulo de nutrientes no solo e temperaturas mais favoráveis ao desenvolvimento do feijoeiro comum.

Com relação à sobrevivência do patógeno e dos isolados de *T. harzianum* ao final do ciclo da cultura, verificou-se relação negativa (ajustada por um modelo quadrático) entre a densidade de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> de solo e o número de propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo das microparcelas experimentais das safras de 2009/2010 e 2010 (Figura 4). O isolado CEN290 apresentou 157,5 e 270 propágulos de *F. oxysporum* e *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo, respectivamente. Como este isolado, em particular, apresentou apenas a livre proliferação

no solo, sem efeitos para o biocontrole de *F. oxysporum*, não foi incluído na correlação da Figura 4.



**Figura 4** – Relação entre o número de propágulos de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> de solo e o número de propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo das microparcelas experimentais das safras de 2009/2010 (verão) e 2010 (inverno), coletados no momento da colheita. Santo Antônio de Goiás, GO. \*O isolado CEN290 apresentou 157,5 e 270 propágulos de *F. oxysporum* e *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo, respectivamente. Os valores médios para o controle (Microparcelas não infestadas com *F. oxysporum*) foram inferiores a 20 propágulos g<sup>-1</sup> de solo para os dois fungos. \*\*Significativo pelo teste F (P≤0,01).

Os tratamentos especificados na Figura 4 podem ser divididos em 4 grupos: **1)** Carboxin+Thiram, cujas microparcelas não receberam aplicações de *T. harzianum*. Exibiram apenas uma população insignificante de *Trichoderma* spp. pré-existente e sem efeito no decréscimo da população de *F. oxysporum* aplicado ao solo, que se apresentou com valores acima aos do monitoramento (Figura 3) realizado ao longo dos experimentos. Este tratamento foi superior aos demais quanto ao número de propágulos de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> (Tabela 6); **2)** Similarmente, a Testemunha foi inferior aos demais tratamentos quanto ao número de propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo. Entretanto, a média de propágulos de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> de solo encontrada foi inferior (281) ao tratamento Carboxin+ Thiram (410); **3)** CEN288, CEN289, CEN316 e isolado comercial representaram um grupo intermediário, com uma população do antagonista aplicado entre 40 e 80 propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo e com efeito no decréscimo da população de *F. oxysporum* aplicado ao solo, que se apresentou com valores inferiores aos do monitoramento (Figura 3) realizado ao longo dos experimentos e **4)** CEN287 representou o melhor resultado, cuja população do antagonista aplicado foi de 146 propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo e com efeito notável no decréscimo da população de *F. oxysporum* aplicado ao solo, cujo nível populacional (56 propágulos de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> de solo) se reduziu ao mesmo da população inicial

encontrada antes da primeira infestação. Em ambos os casos, o isolado CEN287 diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 6).

**Tabela 6** – Número de propágulos de *F. oxysporum* e *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo das microparcelas experimentais das safras de 2009/2010 (verão) e 2010 (inverno), coletados no momento da colheita. Santo Antônio de Goiás, GO<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Propágulos de <i>F. oxysporum</i> g <sup>-1</sup> de solo	Propágulos de <i>Trichoderma</i> g <sup>-1</sup> de solo
CEN287	56,25 a	146,25 d
CEN288	225,00 b	90,00 c
CEN289	191,25 b	45,00 b
CEN316	191,25 b	78,75 c
Isolado comercial	168,75 b	67,50 c
Carboxin+Thiram	410,00 d	11,25 a
Microparcelas infestadas <sup>(2)</sup>	281,25 c	22,50 a
Coefficiente de variação	26,77%	28,54%

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05). <sup>(2)</sup>Microparcelas infestadas pelo isolado FOP 46 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, sem aplicação de *Trichoderma* nos sulcos.

O fato de CEN290 não ter proporcionado bons resultados no controle da murcha de fusárium do feijoeiro, não pode excluí-lo de outros empregos na agricultura. Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) verificaram que a capacidade de proliferação no solo e na região da rizosfera das plantas (rizocompetência) apresentada por isolados de *Trichoderma* estava mais relacionada com a capacidade destes isolados em promover o crescimento inicial do feijoeiro, do que com a produção de análogos de auxinas, por exemplo.

Apesar da sua eficiência no tratamento de sementes e controle de *F. oxysporum* f.sp *phaseoli*, o fungicida Carboxin+Thiram não foi capaz de proteger as plantas nos seu estágio reprodutivo. Embora seja importante para a formação de estande e sanidade das plântulas, ficou claro no presente trabalho, a necessidade de medidas complementares para o controle da murcha de fusário.

A Figura 4 evidencia a maior densidade de *Trichoderma* no tratamento com o isolado CEN287, que foi cerca de sete vezes superior à testemunha, e também a menor população de *F. oxysporum* no mesmo tratamento. Este resultado demonstra a capacidade de CEN287 de se estabelecer em campo e reproduzir os resultados observados em ambiente controlado (Figuras 1 e 2; Tabela 3) e a sua adaptabilidade ecológica (Tabela 4). Ao longo de dois ciclos de cultivo de feijão comum, as duas aplicações de *T. harzianum* realizadas no momento dos plantios permitiram encontrar, no momento da colheita, em média, 40-80 propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo nas microparcelas que receberam aplicação de

CEN288, CEN289, CEN316 e isolado comercial, e 146 propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo para CEN287, ao final de cada uma das colheitas.

Este fato sugere que o isolado CEN287 possuiu melhor habilidade para manter a população estável sob as condições avaliadas, em comparação aos demais isolados de *T. harzianum*. Estes resultados estão em conformidade com o trabalho de Mohamed & Haggag (2006), que obtiveram redução da população de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em casa de vegetação e em campo, ao tratar sementes de tomate com suspensão de *T. harzianum* calibrada a 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup> e respectiva redução da incidência de murcha em tomateiro nos dois ambientes.

Outras relações entre variáveis avaliadas no presente estudo demonstram a consistência dos resultados obtidos, a importância na redução do inóculo inicial do patógeno no controle da doença, e aumento de produtividade correspondente. A incidência (%) e índice de doença (%) foram relacionados à densidade de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> de solo nas safras de 2009/2010 e 2010 (P≤0,01) com R<sup>2</sup> de 0,78 e 0,66 para 2009/2010 e 0,33 e 0,32 para 2010, respectivamente, por modelos lineares positivos (Tabela 7).

A produtividade do feijoeiro comum foi reduzida linearmente conforme a quantidade de propágulos de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> no solo, com R<sup>2</sup> de 0,76 (P≤0,02) para a safra de 2009/2010. Opostamente aos modelos obtidos com *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> de solo, a quantidade de propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo x incidência (%) nas safras de 2009/2010 e 2010 correlacionaram-se (P≤0,01) com R<sup>2</sup> de 0,80 e 0,57, respectivamente. Já o número de propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo x índice de doença (%) correlacionaram-se (P≤0,01) com R<sup>2</sup> de 0,90 apenas na safra de 2009/2010. A quantidade de propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo x produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) foi obtida por modelo linear positivo, com R<sup>2</sup> de 0,55 (P≤0,02) para a safra de 2010.

**Tabela 7** – Relações entre a incidência de murcha de fusário (%), índice de murcha (%) aos 64-67 DAS e produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) aos 85 DAS com o número de propágulos de *F. oxysporum* g<sup>-1</sup> de solo e o número de propágulos de *Trichoderma* g<sup>-1</sup> de solo das microparcelas experimentais, coletados no momento da colheita, para as safras de 2009/2010 (verão) e 2010 (inverno), separadamente.

Safra 2009/2010	Modelo	R <sup>2</sup> (%)	(P≤X)
incidência (%) x <i>F. oxysporum</i> g <sup>-1</sup> solo	y= 0,1073x + 41,3382	78,56	0,01
índice doença (%) x <i>F. oxysporum</i> g <sup>-1</sup> solo	y= 0,0366x + 20,3776	65,92	0,01
produtividade (kg ha <sup>-1</sup> ) x <i>F. oxysporum</i> g <sup>-1</sup> solo	y= -1,6248x + 3585,7463	76,33	0,02
incidência (%) x <i>Trichoderma</i> g <sup>-1</sup> solo	y= 0,0019x <sup>2</sup> -0,6234x + 84,4922	80,20	0,01
índice doença (%) x <i>Trichoderma</i> g <sup>-1</sup> solo	y= 0,0007x <sup>2</sup> -0,2423x + 36,4689	90,79	0,01
<b>Safra 2010</b>			
incidência (%) x <i>F. oxysporum</i> g <sup>-1</sup> solo	y= 0,1093x + 46,2329	32,75	0,01
índice doença (%) x <i>F. oxysporum</i> g <sup>-1</sup> solo	y= 0,0409x + 21,8928	31,38	0,01
incidência (%) x <i>Trichoderma</i> g <sup>-1</sup> solo	y= 0,0011x <sup>2</sup> -0,4240x + 97,8892	57,16	0,01
produtividade (kg ha <sup>-1</sup> ) x <i>Trichoderma</i> g <sup>-1</sup> solo	y= 1,7627x + 3481,3225	54,79	0,02

Os percentuais de correlação (R<sup>2</sup>) da safra de 2010 foram, geralmente, menores do que os obtidos na safra 2009/2010 (Tabela 7). Isso se deve, provavelmente, à maior pressão de inóculo e menor eficiência de vários isolados verificada em 2010 (Tabela 4), o que fez com que apenas CEN287 e CEN316 fossem efetivos nesta safra.

O efeito de *Trichoderma* sobre o crescimento e rendimento do feijoeiro comum, tem sido verificado na ausência de doenças (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009). Entretanto, foi possível verificar no presente trabalho, os efeitos de *T. harzianum* sobre a população de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* no solo (Figura 4), responsáveis pela diminuição da incidência de murcha e permitindo aumento do rendimento da cultura. Harman *et al* (2004), relataram que, geralmente, o incremento em produtividade das plantas é mais evidente sob condições de estresse do que quando a planta se encontra em condições próximas ao seu ótimo para crescimento. Mas, mesmo na ausência de condições de estresse, *T. harzianum* pode promover o crescimento de plantas, visto a sua conhecida capacidade para produção de metabólitos promotores do crescimento de plantas (Vinale *et al.*, 2009).

A rápida propagação em laboratório e a persistência apresentada, principalmente pelo isolado CEN287, representam boas qualidades para seu emprego como biocontrolador de patógenos do solo (Longa *et al.*, 2009). A descoberta, principalmente dos isolados CEN287 e CEN316, é de extrema importância para o manejo da murcha de fusário do

feijoeiro comum, cuja escassez de trabalhos envolvendo o controle biológico desta doença é notória. Com esses resultados, torna-se possível inserir o controle biológico da murcha de fusário a outras táticas de manejo, como uso de cultivares resistentes, controle físico e cultural, melhorando o manejo integrado da doença, ocupando espaços onde outras técnicas não são eficientes.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstraram que o tratamento de sementes de feijão com *T. harzianum* (CEN287 e CEN316) foi capaz de reduzir a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes de feijão 'BRS Valente', ocasionando melhor sanidade e vigor das plântulas. Todos os isolados de *Trichoderma* possuem algum potencial em exercer antibiose ao patógeno *in vitro*, seja por mv ou mnv. Entretanto, CEN287 e CEN316 apresentaram maior eficiência em controlar a murcha de fusário em campo. Especialmente, CEN287 foi capaz de se estabelecer, colonizar e de se reproduzir no ecossistema, diminuindo a população de *F. oxysporum* no solo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por uma bolsa de doutorado.

## REFERÊNCIAS

ABAWI, G.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research methodologies, and management strategies**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1990. 114p.

AGRIOS, G. N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2005.

AGÜERO, L.E.M.; ALVARADO, R.; MARTÍNEZ, A.; DORTA, B. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* Rifai. **Interciência**, v.33, p.219-222, 2008.

ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; MIGHELI, Q.; STEINBERG, C. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, v.184, p.529-544, 2009.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n.4, p.379-382, 1982.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold chemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v.83, p.1062-1071, 1993.

BOSSOLA, J.J.; RUSSEL, L.D. **Electron Microscopy**. 2 ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 670p. 1998.

CÂNDIDA, D.V.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, M.S. Controle genético da murcha do fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.6, p.379-394, 2009.

CORRÊA, B.O.; MOURA, A.B.; DENARDIN, N.D.; SOARES, V.N.; SCHÄFER, J.T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p.156-163, 2008.

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M.C. 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.36-42, 2011.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.1023-1030, 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.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.

HALL, R.; NASSER, L. C. B. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Disease** v.18, p.176-185, 1996.

HALL, R.; PHILLIPS, L.G. Effects of crop sequence and rainfall on population dynamics of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in soil. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.2005-2008, 1992.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.43-56, 2004.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v.51, p.409-416, 2009.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology & Biochemistry**, v.28, n.6, p.757-763, 1996.

JOHN, R.P.; TYAGI, R.D.; PRÉVOST, D.; BRAR, S.K.; POULEUR, S.; SURAMPALLI, R.Y. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop Protection**, v.29, p.1452-1459, 2010.

KHAN, M.R.; KHAN, S.M.; MOHIDDIN, F.A. Biological control of Fusarium wilt of chickpea through seed treatment with the commercial formulation of *Trichoderma harzianum* and/or *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathologia Mediterranea**, v.43, p.20-25, 2004.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Blackwell Professional Publishing, Ames, Iowa, 2006, 385p.

LOBO JÚNIOR, M.; ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonista em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.521-526, 2000.

LONGA, C.M.O.; SAVAZZINI, F.; TOSI, S.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1549-1557, 2009.

LORITO, M.; PETERBAUER, C.; HAYES, C.K.; HARMAN, G.E. Synergistic Interaction between Fungal Cell Wall Degrading Enzymes and Different Antifungal Compounds Enhances Inhibition of Spore Germination. **Microbiology**, v.140, p.623-629, 1994.

LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L.M. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.145-149, 2009.

McKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v.6, p.195-218, 1923.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v.11, n.1, p.3-9, 2007.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v.39, p.13-18, 2009.

MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 181-191, 2006.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas no Brasil**. p. 7-14. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p.



OLIVEIRA, T.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. Avaliação da atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* sp. para biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 7 p. (**Comunicado Técnico**, 177).

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R.R.; CARNEIRO, J.E.S.; ANDRADE, M.J.B.; REZENDE, A.M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009**. Viçosa: EPAMIG-CTZM, 2008, 180p.

REGRAS para análise de sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 399p.

SHALI, A.; GHASEMI, S.; AHMADIAN, G.; RANJBAR, G.; DEHESTANI, A.; KHALES, N.; MOTALLEBI, E.; VAHED, M. *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. **Phytoparasitica**, v.38, p.141-147, 2010.

VINALE, F.; FLEMATTI, G.; SIVASITHAMPARAM, K.; LORITO, M.; MARRA, R.; SKELTON, B.W.; GHISALBERTI, E.L. Harzianic Acid, an Antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, v.72, n.11, p.2032-2035, 2009.

ZEILINGER, S.; OMANN, M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. **Gene Regulation and Systems Biology**, v.1, p.227-234, 2007.

## **CAPÍTULO 4**

**Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum***

**(Formatado de acordo com o periódico *Tropical Plant Pathology*)**

## RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar seis isolados de *Trichoderma harzianum* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes, e seu efeito no crescimento inicial do feijoeiro comum. Os isolados foram inicialmente confrontados *in vitro* com o patógeno em testes de cultura pareada e antibiose a 25°C. Sementes sadias e artificialmente contaminadas pelo patógeno foram microbiolizadas com 2 mL de suspensões dos antagonistas ( $2,5 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) para cada 100 g de sementes, em rolo de papel germtest a 20 e 25°C. Os percentuais de incidência do patógeno e de plântulas normais foram avaliados aos sete e nove dias, respectivamente. Em casa de vegetação, os isolados foram aplicados a  $5 \times 10^9$  conídios 500 g<sup>-1</sup> de substrato autoclavado, com avaliação do comprimento das raízes e parte aérea das plantas 11 dias após o semeio (12 plantas tratamento<sup>-1</sup>). Todos os isolados apresentaram antagonismo *in vitro* contra o patógeno. Os isolados CEN202, CEN234, CEN238, CEN240 foram superiores à testemunha no controle de *F. oxysporum* em sementes, reduzindo entre 35 e 51% da incidência do patógeno e proporcionando entre 73 e 81% de plântulas normais. O comprimento total das plantas com tratamento CEN239 (37,43 cm) foi superior aos demais, cujo comprimento variou entre 27,84 e 33,95 cm.

**Palavras chave:** *Phaseolus vulgaris*, controle biológico, patologia de sementes, supressão de crescimento.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antagonistic capacity of six isolates of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on infected seeds and its effect in the early stages of growth on bean plants. The isolates were also evaluated in dual culture assays and, its *in vitro* antibiosis at 25°C. Healthy and infected seeds were treated with 2 mL 100 g<sup>-1</sup> seeds of the antagonists suspensions (2.5 x 10<sup>8</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) for healthy evaluation using blotter method at 20 and 25°C. The percentages of the pathogen incidence and normal seedlings were evaluated at seven and nine days, respectively. The isolates were applied at 5 x 10<sup>9</sup> conidia 500 g<sup>-1</sup> of sterilized substrate in greenhouse. After 11 days, roots and shoots of the bean plants were measured (12 plants treatment<sup>-1</sup>). Every isolate of *T. harzianum* presented *in vitro* antagonism against the pathogen. CEN202, CEN234, CEN238 and CEN240 offered better *F. oxysporum* control on seeds than the positive check, causing a reduction between 35 and 51% in pathogen incidence and 73-81% of normal seedlings emergency. The total length of the plants treated with CEN239 (37.43 cm) was longer than the others treatments, with length varying between 27.84 and 33.95 cm.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, biocontrol, seed pathology, growth suppression.

## INTRODUÇÃO

As sementes são importantes veículos de agentes fitopatogênicos, os quais podem provocar redução, tanto na germinação quanto no vigor das plântulas. Invariavelmente, sementes infectadas ou infestadas por patógenos originam focos primários de infecção (Machado *et al.*, 2001). Doenças de importância econômica para a cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) são causadas por patógenos transmitidos pelas sementes, dentre eles o fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, causador da murcha de fusário do feijoeiro (Paula Júnior *et al.*, 2008). As estruturas do patógeno presentes nas sementes permanecem viáveis durante o período de armazenamento e constituem o inóculo primário para o desenvolvimento de epidemias (Silva *et al.*, 2008).

O uso de sementes tratadas com agentes de biocontrole é uma das recomendações para conter a transmissão de doenças via sementes, além de contribuir para uma maior densidade de plantas na lavoura (Corrêa *et al.*, 2008). Por outro lado, o tratamento de sementes com fungicidas sintéticos tem sido questionado devido ao uso abusivo desses produtos na agricultura, por onerar os custos de produção e, principalmente, por contaminar o meio ambiente (Vinale *et al.*, 2008).

Espécies de *Trichoderma* são potenciais antagonistas de diversos fungos fitopatogênicos. São vários os mecanismos de ação utilizados por esses fungos, dentre os quais, destacam-se a produção de metabólitos e enzimas com propriedades antifúngicas, o hiperparasitismo e a competição por nutrientes (Harman *et al.*, 2004). Como vantagem adicional, esses microrganismos são referidos como atóxicos ao homem e animais (Mertz *et al.*, 2009) e como simbioses avirulentos associados às plantas (Harman *et al.*, 2004). Portanto, representam uma possível alternativa para controle de patógenos de sementes.

Adicionalmente, alguns isolados de *Trichoderma* têm sido referidos como estimuladores do crescimento vegetal, pela habilidade que possuem na solubilização de fosfato e outros minerais, colocando-os disponíveis para as plantas, e também pela produção de análogos de auxinas (Harman, 2000; Vinale *et al.*, 2008). Tais substâncias apresentam propriedades de induzir a alongação celular nos vegetais superiores (Taiz & Zeiger, 2006). Também é conhecida a ação dos compostos sideróforos - moléculas de baixo peso molecular, quelante de íons férricos e sintetizados por vários microrganismos, dentre os quais *Trichoderma* - que resulta na solubilização do ferro presente no solo, em benefício das plantas. A produção de sideróforos coloca o microrganismo em vantagem sobre seus competidores na competição pelo ferro disponível no ambiente (Benítez *et al.*, 2004).

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes e a promoção do crescimento inicial de plantas de feijoeiro comum por isolados de *Trichoderma harzianum*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os isolados de *T. harzianum* (CEN202, CEN234, CEN238, CEN239, CEN240 e CEN241) e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (C-03-01) utilizados neste trabalho pertencem à Coleção de Microrganismos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF, onde foram realizados os ensaios *in vitro*. A seleção dos seis isolados do antagonista para este estudo foi baseada em resultados anteriores, obtidos no controle de outros patógenos do solo por Ávila *et al.* (2005). As culturas foram reativadas em meio batata-dextrose-ágar (BDA).

### **Avaliação do antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* em cultura pareada**

Para avaliar o antagonismo dos isolados de *T. harzianum* contra o patógeno *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, utilizou-se o método de cultura pareada descrito por Dennis & Webster (1971), sendo que o patógeno foi repicado três dias antes do antagonista, opostamente em cada placa. As placas foram submetidas à temperatura de 25°C em BOD Fanem 347, com fotoperíodo de 12 h. As avaliações consistiram nas medições do diâmetro das colônias do patógeno com régua milimétrica e agrupamento dos isolados em classes, de acordo com escala descrita por Bell *et al.* (1982), aos sete e aos 13 dias após repicagem dos antagonistas, respectivamente. O experimento foi conduzido duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada isolado de *Trichoderma*.

### **Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *T. harzianum* sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli***

Após três dias de crescimento de *F. oxysporum* em BDA a 25°C e fotoperíodo de 12 h, bases de outras placas de Petri de tamanho correspondente, contendo meio BDA solidificado, receberam no seu centro um disco de ágar contendo micélio dos antagonistas. As bases das placas contendo o antagonista recém colocado e o patógeno (com três dias de crescimento) foram sobrepostas e unidas com filme plástico transparente. As placas foram incubadas nas condições mencionadas, de forma que as bases superiores fossem aquelas que continham o patógeno. Após cinco dias, quando a colônia testemunha (base correspondente

ao antagonista contendo apenas BDA solidificado) encontrava-se totalmente colonizada, mediu-se o diâmetro das colônias de *F. oxysporum*. Os valores médios de percentagens de inibição foram obtidos em relação ao crescimento da testemunha. Considerou-se 100% de crescimento a área final ocupada pela testemunha menos a área inicial (patógeno com três dias de crescimento). Para verificar a ação de metabólitos não voláteis, filtrados das culturas de *Trichoderma* foram incorporados ao meio, conforme descrito por Mello *et al.* (2007). Cinco discos (5 mm) contendo micélio de *T. harzianum* foram transferidos para frascos Erlenmeyer (500 mL), contendo 250 mL de meio BD (batata-dextrose). Após cinco dias de cultivo em agitador orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160) a 250 rpm e temperatura de 25°C, em ausência de luz, as culturas foram filtradas, com auxílio de bomba a vácuo. Cada isolado passou por três filtrações, com 1, 2 e 3 papéis de filtro, respectivamente. A parte líquida foi esterilizada por filtração (filtro Millipore 0,45µm). Cinco mililitros do filtrado de cada isolado foi acrescido a 15 mL de BDA fundente contendo ágar a 28%, em placa de Petri. Após solidificação do meio, um disco de ágar (5 mm de diâmetro), contendo micélio do patógeno, foi depositado sobre o meio. Para a testemunha, adicionaram-se 5 mL de água destilada esterilizada ao BDA fundente. As placas foram incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12 h, até completa colonização do meio pelo patógeno, nas placas da testemunha, que se deu no sétimo dia. Tomaram-se, então, as medidas de diâmetro das colônias do patógeno. Os valores obtidos foram convertidos em percentagem, como no item anterior. Os experimentos com metabólitos voláteis e não voláteis foram conduzidos duas vezes, em DIC, com quatro repetições para cada isolado de *Trichoderma*.

### **Multiplicação de inóculo de *T. harzianum***

Para os testes seguintes, conduzidos no Laboratório de Qualidade e Sanidade de Sementes da Embrapa Arroz e Feijão, o inóculo de *T. harzianum* foi multiplicado em substrato sólido. Discos de ágar contendo micélio do antagonista foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL), contendo arroz parboilizado (15 g frasco<sup>-1</sup>), previamente umedecido com água destilada (60% p v<sup>-1</sup>) e autoclavado. Os frascos foram mantidos em BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante seis dias. Os esporos foram coletados por meio de filtração em gaze esterilizada, de uma suspensão obtida pela adição de água destilada esterilizada ao substrato. As concentrações de esporos foram determinadas com o auxílio de câmara de Neubauer, sob lente de 40x.

### **Infecção e infestação de sementes com *F. oxysporum***

Para obtenção de sementes contaminadas por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, empregou-se a técnica de restrição hídrica utilizando-se meio BDA + Manitol a -1,0 MPa (Costa *et al.*, 2003). Após seis dias de cultivo do patógeno nas placas de 15 cm (seis discos/placa) e constatada a colonização total da superfície do meio, as placas receberam sementes de feijão 'Jalo Precoce'. Essas sementes foram previamente desinfestadas (1 min com hipoclorito de sódio 1%), lavadas duas vezes por 1 minuto em água destilada esterilizada e submetidas à secagem em câmara de fluxo laminar (20 min). As sementes assim preparadas e distribuídas na superfície do meio colonizado foram, então, incubadas por cinco dias.

### **Análise sanitária das sementes tratadas com *T. harzianum***

Após o procedimento anterior, realizou-se o tratamento das sementes com *T. harzianum*, empregando-se os seis isolados descritos anteriormente, mais um isolado comercial da mesma espécie (Trichodermil® SC, Itaforte Bioprodutos, Itapetininga, SP). Utilizaram-se 2 mL de suspensão a  $2,5 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> para cada 100 g de sementes. Em seguida, foi realizada a análise de sanidade de sementes conforme as Regras para Análise de Sementes (2009). Neste teste, cada tratamento constou de 200 sementes, divididas em quatro repetições. Em cada uma, 50 sementes foram distribuídas uniformemente sobre duas folhas de papel *germitest* (44,0 x 34,0 cm), umedecidas com água destilada e cobertas com uma terceira folha umedecida para fechamento do rolo de papel. Os rolos de papel contendo as sementes foram colocados dentro de saco de polietileno preto e encaminhados para sala de incubação (20°C e umidade relativa de 98%), onde permaneceram pelo período de sete dias. A verificação da incidência do patógeno consistiu na observação, ao microscópio estereoscópio (Zeiss Stemi DV4), de: micélio aéreo, monofiálides, microconídios e macroconídios típicos de *F. oxysporum* ao redor das sementes e plântulas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (2009). A confirmação da espécie ocorreu mediante confecção de lâminas microscópicas semi-permanentes e análise destas sob lente de aumento 40x (microscópio ótico Nikon Eclipse 55i). Como controles, empregaram-se sementes tratadas com fungicida químico Carboxin+Thiram a 300 mL 100 kg<sup>-1</sup> sementes (200 g L<sup>-1</sup> de carboxina; 200 g L<sup>-1</sup> de thiram) e sementes não tratadas, respectivamente. Utilizou-se o DIC, com quatro repetições de 50 sementes (rolo de papel), por tratamento.



### **Testes de germinação e vigor de sementes**

O teste de sanidade foi acompanhado por dois testes de germinação, com sementes de feijão comum cv. 'Jalo Precoce' contaminadas com o patógeno. Em ambos os casos, as sementes foram submetidas ao tratamento com os isolados de *T. harzianum*, na mesma dosagem empregada para o teste de sanidade. O experimento foi conduzido em DIC, com quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes organizadas em rolos, como no ensaio anterior, foram acondicionadas em germinador De Leo à temperatura de 25°C, onde permaneceram por nove dias. Na avaliação, foram estimadas as porcentagens de plântulas normais, segundo as Regras para Análise de Sementes (2009).

### **Efeito de *T. harzianum* no crescimento de plantas de feijoeiro comum em casa de vegetação**

Vasos de 500g de capacidade, contendo o substrato comercial autoclavado Plantmax<sup>®</sup>, receberam um volume de 50 mL /vaso de suspensão de esporos ( $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) de *T. harzianum*, perfazendo  $5 \times 10^9$  conídios 500 g<sup>-1</sup> de substrato. Imediatamente após, foram semeadas cinco sementes de feijão 'Jalo Precoce' por vaso. Após 11 dias, procederam-se às avaliações, tomando-se as medidas de comprimento de raízes e parte aérea de 12 plantas por tratamento. Com o objetivo de verificar se um tratamento adicional ao tratamento de substrato com *Trichoderma* era capaz de promover ainda mais o crescimento das plantas, outro experimento foi instalado com os mesmos tratamentos. Entretanto, as sementes deste experimento foram tratadas com promotor de crescimento Rhal S1<sup>®</sup> (18% de ácidos húmicos + 1,5% de ácidos fúlvicos; Rhal Produtos Agropecuários, Criciúma, SC), na dosagem de 600 mL do produto comercial 100 kg<sup>-1</sup> sementes. Os experimentos foram dispostos em DIC com quatro repetições (4 vasos) para cada isolado do antagonista. Como controles para os dois experimentos, empregaram-se sementes semeadas em substrato autoclavado não tratado com *T. harzianum*. As sementes da Testemunha do primeiro experimento não foram tratadas com Rhal S1<sup>®</sup> (Testemunha absoluta).

### **Análises estatísticas**

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ), com o auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Avaliação do antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* em cultura pareada**

Os valores médios de crescimento de colônias do patógeno, em relação à testemunha, verificado aos sete dias de cultivo, foram menores com os isolados CEN234, CEN238, CEN239 e CEN241 (Tabela 1). Entretanto, aos 13 dias de cultivo pareado, os isolados CEN238, CEN239 e CEN241 foram os que apresentaram colonização total sobre o patógeno. Assim, estes foram agrupados na classe 1, de acordo com escala de Bell *et al.* (1982). Após o contato entre colônias de antagonista e patógeno, esses três isolados continuaram em crescimento, invadindo totalmente a colônia do patógeno, sobre as quais produziram conídios. Todos os demais isolados também revelaram bom potencial contra o patógeno testado e foram agrupados na classe 2, da mesma escala (Tabela 1).

A redução do crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* verificada na Tabela 1 pode ser atribuída à competição por espaço e por nutrientes presentes no meio de cultura e/ou ao hipeparasitismo (Vinale *et al.*, 2008).

### **Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *T. harzianum* sobre *F. oxysporum***

Quanto à produção de metabólitos secundários voláteis, todos os isolados de *T. harzianum* testados exibiram ação antifúngica e não diferiram entre si (Tabela 2). Os valores médios de porcentagem de inibição situaram-se próximos a 50%.

Já no experimento para verificação do efeito de metabólitos não voláteis, o isolado CEN239 foi o único que se distinguiu dos demais, não diferindo da testemunha. Pode-se inferir, portanto, que não houve ação por metabólitos tóxicos biologicamente difusíveis no meio de cultivo que recebeu filtrado de colônia deste isolado (Tabela 2). De fato, a capacidade para produzir metabólitos tóxicos com efeito fungicida ou fungistático pode variar entre isolados da mesma espécie (Martins-Corder & Melo, 1998). Embora Dubey *et al.* (2007) tenham constatado em *T. harzianum* a capacidade de inibir o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* pela produção de metabólitos não voláteis, os melhores resultados foram proporcionados pela produção de metabólitos voláteis (Tabela 2).

### **Análise sanitária das sementes tratadas com *Trichoderma harzianum* e testes de germinação e vigor**

O fungicida Carboxin+Thiram foi o melhor tratamento no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes de feijão, reduzindo em 73% a incidência do patógeno nas sementes, aos sete dias após o tratamento químico e biológico das sementes contamiadas. Embora nenhum dos tratamentos biológicos tenha sido estatisticamente similar ao fungicida químico, os isolados CEN202, CEN234, CEN238, CEN240 e o isolado comercial foram superiores à testemunha (sementes não tratadas) no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, reduzindo a incidência do patógeno em 48, 40, 35, 51 e 45%, respectivamente, nas sementes (Tabela 3).

De forma similar, os tratamentos supracitados proporcionaram um percentual de plântulas normais superiores à testemunha, aos nove dias de germinação, em sementes que receberam aplicação do patógeno. Embora tenha proporcionado incidência de 37% do patógeno aos sete dias, verificou-se 73,6% de plântulas normais aos nove dias, quando as sementes contaminadas foram tratadas com CEN239. Portanto, o isolado CEN239 conferiu um aumento de vigor às sementes contaminadas.

Outro ponto importante a ser destacado reside na capacidade de controle biológico de patógenos de sementes pela ação de metabólitos voláteis de *T. harzianum* (Agüero *et al.*, 2008). Conforme verificado *in vitro*, é provável que as diferenças no percentual de incidência do patógeno e de plântulas normais oriundas das sementes contaminadas tenha sido causada pela ação desses metabólitos, para todos os isolados de *T. harzianum*. De forma análoga, Dubey *et al.* (2007), após selecionarem isolados de *Trichoderma* baseando-se em testes *in vitro* de cultura pareada e metabólitos voláteis e não voláteis, também verificaram o controle *in vivo* de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ao realizar a microbiolização com  $10^6$  conídios de *Trichoderma* spp.  $10\text{ g}^{-1}$  de sementes de grão de bico, semeadas em vaso com solo infestado pelo patógeno. Embora tenham empregado menor concentração do antagonista, Dubey *et al.* (2007) verificaram entre 21 e 30,6% de incidência de murcha nas plantas obtidas de sementes tratadas com *T. harzianum* contra 62 a 74% de incidência nas plantas obtidas de sementes sem tratamento. Tais valores foram muito próximos aos obtidos no presente trabalho, ao se avaliar a incidência nas sementes e plântulas infectadas por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Por exemplo, CEN202, CEN234, CEN238 e CEN 240 apresentaram 24, 28, 30 e 23% de incidência, respectivamente, contra 47% nas plântulas da testemunha.

Cabe salientar que a incidência do patógeno em sementes não significa necessariamente comprometimento da germinação e origem de plântulas normais (França Neto & Henning, 1984). A presença do patógeno pode estar limitada ao tegumento que, durante o processo de emergência, será deixado no substrato, sem prejuízo sanitário para as plântulas originadas (Mertz *et al.*, 2009).

O tratamento com 2 mL de suspensão a  $2,5 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de *T. harzianum* para cada 100 g de sementes sadias de feijoeiro não ocasionou sintomas de toxidez ou qualquer outro prejuízo à germinação das sementes. Três dos seis isolados (CEN238, CEN240 e CEN241), assim como o isolado comercial, proporcionaram percentuais de plântulas normais superiores às provenientes de sementes não tratadas. Por outro lado, CEN241 foi o único isolado que não apresentou efeito no controle de *F. oxysporum* f. *phaseoli* nas sementes.

Quando se compararam sementes contaminadas e sementes que não receberam o inóculo do patógeno, os tratamentos com os isolados CEN202 e CEN234 não proporcionaram incremento no vigor das sementes. Portanto, pode-se inferir que os dois últimos isolados são mais aptos em controlar *F. oxysporum* em sementes de feijão do que em promover um incremento no percentual de plântulas normais oriundas de sementes sadias.

### **Efeito de *Trichoderma harzianum* no crescimento de plantas de feijoeiro em casa de vegetação**

Os valores médios de comprimento da parte aérea das plantas oriundas de sementes não tratadas com Rhal S1<sup>®</sup> em substrato tratado com *T. harzianum* (isolados CEN202, CEN239, CEN240 e CEN241) foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos (Tabela 4).

Na avaliação do comprimento médio das raízes das mesmas plantas, CEN239 foi superior à testemunha (sementes sem tratamento em substrato autoclavado). Opostamente, o comprimento médio das raízes de CEN238 e CEN240 foram inferiores ao da testemunha absoluta, sugerindo efeito negativo desses isolados de *T. harzianum*, quando aplicados na dosagem de 50 mL de suspensão a  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  por vaso. Tal efeito foi evidenciado para o isolado CEN238, cuja maioria das plantas exibiu áreas necrosadas na raiz pivotante, no momento da avaliação. Embora esses efeitos de *Trichoderma* em plantas sejam eventos raros, Carvalho *et al.* (2006) relataram produção de metabólitos tóxicos a coleóptilos de

trigo por *T. viride*. Vale ressaltar que a maioria dos relatos encontrados na literatura refere-se à capacidade de fungos do gênero *Trichoderma* em promover o crescimento e a produtividade das culturas (Vinale *et al.*, 2008). O isolado T-22 de *T. harzianum* é comercializado em vários países como princípio ativo de inoculantes de efeito biofúngida e promotor de desenvolvimento de plantas. Harman (2000) relatou promoção de crescimento com esse isolado nas culturas de soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) e milho (*Zea mays* L.), além de incremento na produção de frutos de pimentão (*Capsicum annum* L.). Provavelmente, o efeito negativo verificado seja função de dose e, principalmente, do isolado, visto que, no presente trabalho, repetido duas vezes, observou-se efeito positivo com o isolado CEN239.

Quando as sementes foram tratadas com o promotor de crescimento Rhal S1<sup>®</sup>, adicionalmente ao tratamento com *T. harzianum*, não se constataram diferenças entre tratamentos, tampouco destes em relação à testemunha, no comprimento da parte aérea das plantas. Quanto ao comprimento de raízes e comprimento total de plântulas, todos os tratamentos foram inferiores à testemunha, à exceção do isolado CEN239.

Rhal S1<sup>®</sup> é um promotor de enraizamento, cujo efeito foi confirmado neste trabalho. O incremento médio de crescimento de raízes com esse produto foi de 24,8% (Tabela 4). De acordo com Silva *et al.* (2000), esse efeito pode ser atribuído às substâncias húmicas presentes na composição do produto. Entretanto, o presente trabalho mostrou que o seu emprego, simultaneamente às inoculações com *Trichoderma*, não é indicado.

## CONCLUSÕES

Os seis isolados de *T. harzianum* testados possuem potencial como antagonistas contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A produção de metabólitos voláteis é um mecanismo de ação comum a todos esses isolados. Como promotor de crescimento, pode-se indicar o isolado CEN239. É importante que os estudos com esses isolados de *T. harzianum*, associados ou não com reguladores de crescimento, sejam continuados para observação desses efeitos em outras culturas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF), pela concessão de bolsas e auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- AGÜERO, L.E.M.; ALVARADO, R.; MARTÍNEZ, A.; DORTA, B. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* Rifai. **Interciência**, v. 33, p. 219-222, 2008.
- ÁVILA, Z. R.; CARVALHO, S. S.; BRAÚNA, L. M.; GOMES, D. M. P. A.; SILVA, M. C. F.; MELLO, S. C. M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsi* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos. 2005. (**Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa**, 177), 30 p.
- BELL, D.K.; WELLS. H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.
- CARVALHO, D.D.C.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P.; PASQUAL, M.; GIMARÃES, R.M.; CORRÊA, R.S.B. Avaliação da capacidade de produzir fitotoxinas *in vitro* por parte de fungos com propriedades antagônicas a nematóides. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 1230-1235, 2006.
- CORRÊA, B.O.; MOURA, A.B.; DENARDIN, N.D.; SOARES, V.N.; SCHÄFER, J.T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p.156-163, 2008.
- COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.1023-1030, 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.
- DUBEY, S.C.; SURESH, M.; SINGH, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. **Biological Control**, v. 40, p. 118-127, 2007.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.
- FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1984. 39p.
- HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-393, 2000.

- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.43-56, 2004.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p.95-101, 2001.
- MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, v.55, p.01-07, 1998.
- MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v.11, n.1, p.3-9, 2007.
- MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v.39, p.13-18, 2009.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R.R.; CARNEIRO, J.E.S.; ANDRADE, M.J.B.; REZENDE, A.M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009**. Viçosa: EPAMIG-CTZM, 2008, 180p.
- REGRAS para análise de sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 399p.
- SILVA, G.C.; GOMES, D.P.; KRONKA, A.Z.; MORAES, M.H. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 29-34, 2008.
- SILVA, R.M.; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Desenvolvimento das raízes do milheto (*Pennisetum glaucum* L.) cultivado com adição de substâncias húmicas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, p. 152-156, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 2006. 764p.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

**TABELA 1** – Crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em cultivo pareado com isolados de *Trichoderma harzianum* e classificação dos isolados quanto ao antagonismo, segundo escala de Bell *et al.* (1982) após sete e 13 dias de incubação, respectivamente<sup>(1)</sup>.

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Diâmetro médio das colônias de <i>F. oxysporum</i> (mm) aos 7 dias	Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> aos 13 dias <sup>(2)</sup>
CEN202	41,2 b	1,9
CEN234	36,5 a	1,9
CEN238	36,7 a	1,4
CEN239	36,7 a	1,4
CEN240	40,5 b	1,8
CEN241	36,2 a	1,2
Coefficiente de variação	3,72%	26,74%

<sup>(1)</sup>Valores sem letras não foram significativos segundo análise de variância, e seguidos pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ); <sup>(2)</sup>Classe 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Classe 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

**TABELA 2** – Efeito inibidor de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Crescimento de colônias de <i>F. oxysporum</i> sob o efeito de metabólitos de <i>T. harzianum</i> <sup>(1)</sup>	
	Metabólitos voláteis (%) <sup>(2)</sup>	Metabólitos não voláteis (%) <sup>(2)</sup>
CEN202	47,9 aA	86,4 aB
CEN234	48,0 aA	86,0 aB
CEN238	51,1 aA	86,2 aB
CEN239	48,1 aA	93,8 bB
CEN240	52,2 aA	81,3 aB
CEN241	51,7 aA	85,6 aB
Testemunha <sup>(3)</sup>	100,0 b	100,0 b
Média	49,8 A	86,6 B
Coefficiente de variação	9,91%	5,88%

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ); <sup>(2)</sup>Valores relativos a Testemunha, obtidos de colônias com 8 e 7 dias de crescimento, para os ensaios com metabólitos voláteis e não voláteis, respectivamente; <sup>(3)</sup>Metabólitos voláteis: sem adição de disco do antagonista na placa correspondente; Metabólitos não voláteis: adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada ao BDA fundente das placas;



**TABELA 3** – Incidência de *Fusarium oxysporum* em sementes e plântulas de feijão comum cv. ‘Jalo Precoce’ tratadas com isolados de *Trichoderma harzianum* e respectivos efeitos sobre a germinação de sementes contaminadas e não contaminadas pelo patógeno<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Incidência (%)		Germinação (%)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Plântulas normais – sementes contaminadas por <i>F. oxysporum</i>	Plântulas normais – sementes sadias	
CEN202	24,5 b	77,0 aA	84,0 bA	
CEN234	28,0 b	81,5 aA	86,6 bA	
CEN238	30,5 b	77,5 aA	92,6 aB	
CEN239	37,0 c	73,6 aA	87,3 bB	
CEN240	23,0 b	73,5 aA	92,6 aB	
CEN241	39,0 c	64,0 bA	91,1 aB	
Isolado comercial	26,0 b	76,0 aA	94,0 aB	
Carboxin+Thiram	13,0 a	84,5 aA	94,5 aB	
Testemunha	47,0 c	58,5 bA	88,0 bB	
Média	-	74,0 A	90,1 B	
Coeficiente de Variação	25,43%	7,56%	4,94%	

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

**TABELA 4** – Comprimento da parte aérea, da raiz e comprimento total de plantas de feijoeiro comum cv. ‘Jalo Precoce’, cultivadas durante 11 dias em substrato tratado com isolados de *Trichoderma harzianum*<sup>(1)</sup>.

Isolados de <i>T. harzianum</i>	Comprimento (cm)					
	Substrato tratado com <i>Trichoderma harzianum</i>			Substrato tratado com <i>Trichoderma harzianum</i> + sementes tratadas com formulação de ácidos húmicos <sup>(2)</sup>		
	Parte aérea	Raízes	Total	Parte aérea	Raízes	Total
CEN202	19,3 aA	14,5 bA	33,9 bA	19,0 aA	13,6 bA	32,6 bA
CEN234	17,9 bA	13,3 bA	31,3 cA	19,2 aB	11,9 cA	31,2 cA
CEN238	18,0 bA	9,8 cA	27,8 dA	18,7 aA	9,6 dA	28,4 dA
CEN239	19,6 aA	17,8 aA	37,4 aA	19,0 aA	16,9 aA	35,9 aA
CEN240	19,4 aB	10,9 cA	30,3 cA	18,1 aA	14,2 bB	32,4 bB
CEN241	19,3 aA	14,5 bA	33,9 bA	18,6 aA	15,3 bA	33,9 bA
Isolado comercial	18,4 bA	15,4 bA	33,8 bA	18,4 aA	14,5 bA	33,0 bA
Testemunha <sup>(3)</sup>	18,5 bA	13,6 bA	32,1 cA	18,6 aA	16,9 aB	35,5 aB
Média	18,8 A	13,7 A	32,6 A	18,7 A	14,1 A	32,9 A
Coeficiente de variação	5,21%	16,55%	7,35%	5,92%	14,67%	7,50%

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ); <sup>(2)</sup>Rhal S1® (18% de ácidos húmicos; 1,5% de ácidos fúlvicos) a 600 mL 100 kg<sup>-1</sup> sementes; <sup>(3)</sup>Sementes em substrato sem adição de *Trichoderma*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir de 40 isolados pertencentes a Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF), cinco isolados (CEN287, CEN 288, CEN289, CEN290 e CEN316) foram selecionados quanto ao antagonismo aos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, causadores do mofo-branco e de murcha, respectivamente, em feijoeiro. A seleção foi baseada em ensaios *in vitro* (culturas pareadas). Procedendo-se, ainda, o exame de amostras retiradas da região de confronto das colônias para verificação de alterações morfológicas e outros sinais de hiperparasitismo exercido por *Trichoderma* sobre os patógenos. Os cinco isolados foram testados quanto à habilidade em suprimir *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, em sementes de feijão comum. Estudou-se, também, a ação desses isolados como promotores do crescimento inicial de plantas de feijão comum, colonizadores de raízes (rizocompetência) e no biocontrole de ambas as doenças, em condições de campo. Adicionalmente, outros seis isolados (CEN202, CEN234, CEN238, CEN239, CEN240 e CEN241) foram avaliados contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijão e na promoção do crescimento inicial de plantas. Como esses seis isolados mencionados estão sendo estudados por outros integrantes do grupo de pesquisa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em relação ao controle biológico do mofo-branco, optou-se por direcionar o primeiro grupo de cinco isolados para os testes de campo contra os dois patógenos referidos acima e, conseqüentemente, constituir o eixo central deste trabalho de tese. A seguir, são apresentadas as considerações finais para todas as componentes exploradas no decorrer destes estudos:

1 - O tratamento de sementes com *T. harzianum* pode reduzir a incidência de *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes de feijão comum, ocasionando melhor sanidade e vigor das plântulas. O tratamento das sementes sadias com *Trichoderma* a 2 mL 100 g<sup>-1</sup> sementes de suspensões dos antagonistas (2,5 x 10<sup>8</sup> conídios mL<sup>-1</sup>) não afeta negativamente o desenvolvimento das plântulas originadas. Os isolados CEN287 e CEN316 destacaram-se entre os isolados testados e, portanto, são os mais indicados para este fim.

2 - Os isolados de *T. harzianum* CEN289 e CEN290 são colonizadores de raízes do feijoeiro 'Jalo Precoce'. No caso específico de CEN290, colonização foi verificada em toda a

extensão das raízes examinadas (primeiros 5 cm e os 5 cm subseqüentes, até a extremidade). Nos testes de campo conduzidos com *F. oxysporum*, o isolado CEN290 apresentou persistência elevada no solo não tratado anteriormente com este fungo antagonista. Em outros experimentos, CEN289 e CEN290 promoveram incremento significativo no comprimento das raízes e comprimento total das plantas. O efeito de promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum foi constatado tanto em casa de vegetação, quanto em condições de campo. Assim, ambos os isolados podem ser utilizados no desenvolvimento de bio-inoculantes para o tratamento de sementes ou em adição a substratos comerciais.

3 – Em ensaios de campo, a aplicação de *T. harzianum* (CEN287, CEN316 e o isolado comercial '1306') reduziu em 46-73% o número de apotécios/m<sup>2</sup> e em 73-96% o percentual de área coberta por mofo branco do feijoeiro. Esses efeitos foram verificados aos 42 e 62 DAS e aos 72 DAS, respectivamente, nos ensaios de campo. CEN287 e o isolado comercial proporcionaram aumento significativo de produtividade de grãos de 2009 para 2010. Esse resultado revelou ser consistente, considerando a reprodutibilidade do controle no ano seguinte, sob maior pressão da doença.

4 – Os isolados CEN287 e CEN316 apresentaram, ainda, maior eficiência em controlar a murcha de fusário em campo, em dois experimentos realizados (safras 2009/2010 e 2010). Especialmente para a safra 2010, quando houve maior pressão de doença, estes dois isolados permitiram índices de murcha similares ao tratamento cujo solo não foi infestado com o patógeno e inferiores à testemunha. Além disso, CEN287 demonstrou ser capaz de se estabelecer, colonizar e de se reproduzir no ecossistema, diminuindo a população de *F. oxysporum* no solo.

5 - Frente ao exposto nos itens 3 e 4 destas considerações finais, fica evidenciada a capacidade dos isolados CEN287 e CEN316 em controlar os patógenos habitantes do solo *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* na cultura do feijoeiro. Entretanto, CEN287 possui melhor capacidade de proliferação no solo do que CEN316.

6 - Quanto ao grupo de seis isolados estudados separadamente no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes, verificou-se a habilidade de CEN202, CEN234, CEN238,

CEN240 na supressão do patógeno. Assim, esses isolados são recomendados para testes de campo, visando ao controle da murcha de fusário do feijão comum. O isolado CEN239, embora não tenha apresentado potencial antagônico contra o patógeno em questão, destacou-se como promotor de desenvolvimento de plântulas de feijoeiro em casa de vegetação.