

Fungos Antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em Pepineiro Cultivado em Estufa*

Luciana Z. Ethur¹, Elena Blume¹, Marlove Muniz¹, Antonio Carlos F. da Silva², Daniela R. Stefanelo¹ & Edileusa K. da Rocha^{1**}

Universidade Federal de Santa Maria, ¹Departamento de Defesa Fitossanitária, ²Departamento de Biologia, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, fax: (55) 220-8015, e-mail: eblume@smail.ufsm.br

(Aceito para publicação em 30/11/2004)

Autor para correspondência: Elena Blume

ETHUR, L.Z., BLUME, E., MUNIZ, M., DA SILVA, A.C.F., STEFANELO, D.R. & DA ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. Fitopatologia Brasileira 30:127-133. 2005.

RESUMO

O mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* pode inviabilizar o cultivo de olerícolas em ambiente protegido. Para elaborar-se um programa de controle biológico desse patógeno, necessita-se de antagonistas adequados. Este trabalho objetivou selecionar antagonistas fúngicos eficazes no controle de *S. sclerotiorum* em pepineiro (*Cucumis sativus*) cultivado em estufa, bem como, analisar a interferência dos antagonistas no crescimento vegetal. Foram utilizados um isolado de *S. sclerotiorum* obtido de pepineiro e 112 isolados fúngicos de quatro gêneros: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Em experimento *in vitro*, foi utilizada a técnica do papel celofane e selecionados oito isolados de *Trichoderma virens*, os quais promoveram maior inibição no crescimento do patógeno (94 a 100%). Dois experimentos *in vivo* foram desenvolvidos em estufa utilizando-se substrato autoclavado e não autoclavado, em copos plásticos, e substrato não autoclavado, em sacos plásticos; o substrato foi infestado com *S. sclerotiorum* e foram utilizados oito isolados de *T. virens* como antagonistas. Todos os isolados testados controlaram o tombamento de mudas, mas o efeito sobre o crescimento vegetal variou de acordo com os isolados e o tratamento do substrato.

Palavras-chave adicionais: biocontrole, solo autoclavado, *Trichoderma virens*, crescimento vegetal, *Cucumis sativus*.

ABSTRACT

Fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on cucumber grown in greenhouse

White mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* may severely damage vegetables grown in greenhouses. To develop a biological control program for this pathogen proper antagonists are needed. This work aimed to select efficient fungi antagonists for controlling *S. sclerotiorum* on cucumber (*Cucumis sativus*) grown in greenhouses, and to evaluate the effect of the antagonist on the growth of the vegetable. An isolate of *S. sclerotiorum* obtained from cucumber and 112 fungi isolates belonging to four genera were used: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Aspergillus*. For the *in vitro* experiment, the cellophane method was used and eight *Trichoderma virens* isolates were selected that had inhibited the pathogen growth by 94 to 100%. Greenhouse experiments used sterilized and non-sterilized substrate in plastic cups and non-sterilized substrate in plastic bags. The substrate was inoculated with *S. sclerotiorum* and the eight isolates of *T. virens* were used as antagonists. All eight isolates controlled damping-off of plants caused by *S. sclerotiorum*, but the effect on cucumber growth varied according to the isolate and the substrate treatment.

Additional keywords: biocontrol, autoclaved soil, *Trichoderma virens*, *Cucumis sativus*.

INTRODUÇÃO

O pepineiro (*Cucumis sativus* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas em estufa no Rio Grande do Sul, existindo uma gama de doenças que se desenvolvem na cultura em ambiente protegido. Entre essas doenças, está o mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, um dos problemas encontrado no cultivo do pepineiro, principalmente em estufa (Cardoso, 1994). Além disso, os cultivos em ambiente protegido sucedem-se de maneira contínua e as culturas utilizadas são, geralmente, suscetíveis

a esse fungo polífago (Purdy, 1979).

Sclerotinia sclerotiorum pode permanecer no solo na forma de escleródios e, a partir destes, produzir germinação carpogênica ou miceliogênica (Purdy, 1979). A germinação miceliogênica causa o tombamento de pré e pós-emergência e a carpogênica o desenvolvimento do mofo branco na parte aérea.

A incidência do mofo branco é favorecida pela alta densidade de plantio, períodos prolongados de precipitação, elevada umidade do ar e temperaturas amenas (Purdy, 1979; Illipronti & Machado, 1993). Em virtude de problemas como a falta de resistência varietal a *S. sclerotiorum* (Li *et al.*, 2003), a resistência a fungicidas por populações de *S. sclerotiorum* (Gossen *et al.*, 2001), e o acúmulo de resíduos

* Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor. Trabalho financiado pela FAPERGS.

** Bolsista FAPERGS.

desse produtos no meio ambiente, especialmente em cultivos protegidos, o controle biológico se apresenta como um método alternativo para o controle do *S. sclerotiorum*.

Alguns fungos foram relatados como importantes agentes de biocontrole de *S. sclerotiorum* tais como *Coniothyrium minitans* Campbell (Huang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003), *Gliocladium roseum* Bainier (Hannusch & Boland, 1996), *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) von Arx (Huang *et al.*, 2000) *T. viride* Pers. Ex Fr. (Hannusch & Boland, 1996), *T. harzianum* Rifai (Illipronti & Machado, 1993; Menendez & Godeas, 1998); *T. hamatum* (Bon.) Bainer (Illipronti & Machado, 1993); *Talaromyces flavus* (Klöcker) A. C. Stock & R. A. Sansom (Melo, 1998; Huang *et al.*, 2000); *Ulocladium atrum* Preuss (Li *et al.*, 2003) *Penicillium* spp. (Rai & Saxena, 1975; Zazzerini & Tosi, 1985); *Fusarium solani* (Mart) Sacc. (Illipronti & Machado, 1993) e *Fusarium* spp. (Zazzerini & Tosi, 1985).

Estudos relacionados ao biocontrole de *S. sclerotiorum* têm focado principalmente a degradação de escleródios, sem um direcionamento à moléstia causada pelo patógeno, especialmente em pepineiro cultivado em ambiente protegido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar antagonistas fúngicos eficazes no controle de *S. sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa, bem como, analisar a interferência dos antagonistas no desenvolvimento vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento dos possíveis antagonistas fúngicos

A metodologia empregada para o isolamento foi o método de iscas (Ghini, 1989), com a utilização dos escleródios de *S. sclerotiorum* (Hoes & Huang, 1975; Illipronti & Machado, 1993; Nasser *et al.*, 1994). Amostras de 500 g de solo foram retiradas da profundidade de até 10 cm, em quatro áreas: estufa, horta, lavoura e jardim, localizadas no município de Santa Maria - RS. Quatrocentos gramas de solo de cada local foram colocados em copos de Becker de 1 l. Foram enterradas, no solo, quatro trouxas feitas com gaze hidrófila (13 fios por cm²; 7,5 cm x 7,5 cm com quatro dobras) e barbante, contendo cinco escleródios de *S. sclerotiorum* cada uma. O solo foi umedecido com 10 ml de água destilada e esterilizada e os copos de Becker, cobertos com papel alumínio, foram mantidos em temperatura ambiente (com variação de 18 a 28 °C), sem a incidência direta da luz solar.

Após um período de 30 dias de incubação, os escleródios foram retirados das trouxas e imersos, por cerca de 1 min, em álcool (70%) e, posteriormente, em hipoclorito de sódio (0,5%). Foram imersos três vezes em água destilada e esterilizada, deixados para secar sobre papel-filtro esterilizado e colocados em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Os fungos encontrados nos escleródios foram repicados para placas de Petri, que continham meio BDA e deixados em câmara climatizada a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h. A

identificação, em nível de gênero, foi feita através de microscópio estereoscópico e ótico, com base em bibliografia especializada (Barnett & Hunter, 1998).

Experimentos *in vitro*

Seleção de agentes de biocontrole produtores de metabólitos não-voláteis - Utilizou-se a técnica do papel celofane (Silva, 1997; Aparecido & Figueiredo, 1999; Durman *et al.*, 1999) com o objetivo de selecionar agentes biocontroladores do *S. sclerotiorum*, produtores de metabólitos não-voláteis.

Foram utilizados 112 isolados fúngicos e um tratamento testemunha apenas com o fitopatógeno, em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Placas de Petri contendo meio BDA foram cobertas, assepticamente, com um disco de papel celofane, esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 30 min, com tamanho suficiente para cobrir toda a placa e ainda sobrar 0,5 cm nas laterais. Um disco de meio BDA, de 12 mm de diâmetro, contendo micélio e esporos dos possíveis antagonistas fúngicos, crescidos em meio BDA por cinco dias, foi colocado no centro das placas, sobre o papel celofane. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 22 °C por 48 h (até o micélio atingir um crescimento de dois terços da placa) quando, então, o papel celofane foi retirado juntamente com a colônia do antagonista fúngico.

Dois discos de micélio retirados das bordas de colônias de *S. sclerotiorum*, crescidos em meio BDA por sete dias, foram transferidos para bordas opostas das placas de Petri contendo os metabólitos não voláteis do possível antagonista. As placas foram incubadas a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após cinco dias de incubação, foi observado o crescimento das colônias e medida a distância (cm) entre os dois discos, sendo considerado 5 cm como o máximo de inibição, ou seja, nenhum crescimento.

Confrontação direta - Os isolados fúngicos selecionados pelo método do papel celofane foram utilizados no método de confrontação direta (Bell *et al.*, 1982; Barros *et al.*, 1987; Silva, 1997), no qual discos do patógeno e do antagonista são colocados em lados opostos de uma placa de Petri, para demonstrar outras formas de ação além da antibiose. Após sete dias em câmara climatizada a 22 °C foi realizada a avaliação de acordo com os critérios propostos por Bell *et al.* (1982) com escala de notas: 1 (antagonista cresce por toda a placa de Petri), 2 (antagonista cresce sobre 2/3 da placa), 3 (antagonista e patógeno crescem até a metade da placa), 4 (patógeno cresce sobre 2/3 da placa) e 5 (patógeno cresce por toda a placa de Petri).

Experimentos *in vivo*

Para a avaliação do potencial de biocontrole de *S. sclerotiorum* em pepineiro, foram realizados dois experimentos utilizando-se as instalações da estufa plástica do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria.

Para o preparo do inóculo de *S. sclerotiorum*, quatro

discos de meio BDA, contendo micélio de *S. sclerotiorum*, foram colocados em frascos de Erlenmeyer de 250 ml que continham 50 g de arroz previamente autoclavados durante 40 min, e levados à câmara climatizada, por quinze dias, a 20 °C, com fotoperíodo de 12 h. Nesse período o fungo colonizou todo o substrato e formou grande quantidade de escleródios.

No preparo do inóculo dos antagonistas, discos de BDA contendo micélio e esporos de oito isolados de *T. vires* foram colocados sobre 50 g de arroz umedecidos com 75 ml de água destilada, em frascos de Erlenmeyer previamente autoclavados por 40 min. Os frascos de Erlenmeyer permaneceram em câmara climatizada a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 15 dias, para a colonização do arroz. Após, ocorreu a secagem em estufa (37° C) e o inóculo foi triturado em liquidificador até ser transformado em pó e passado por uma peneira de 40 meshes.

As sementes de pepino utilizadas nos experimentos são da variedade caipira, para salada. As sementes não receberam qualquer tipo de tratamento anterior à semeadura.

Biocontrole de *S. sclerotiorum* em pepineiro cultivado em substrato autoclavado e não autoclavado - Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 9 x 2 x 2 (isolados de *Trichoderma* - TE4, TE8, TH1, TH7, TH10, TH12, TH15 e TH17 + testemunha) x (presença e ausência de *S. sclerotiorum*) x (substrato autoclavado e não autoclavado).

Copos plásticos, com capacidade para 500 ml, foram preenchidos com 380 g de substrato comercial Plantimax autoclavado (2 h a 120 °C) e não autoclavado. Os copos com substrato autoclavado foram separados daqueles com substrato não autoclavado. O fitopatógeno foi incorporado ao substrato a uma profundidade de 5 cm, usando-se 15 g de inóculo. Após quatro dias, 0,5 g de pó biológico dos isolados de *T. vires* foi espalhado nas covas e quatro sementes de pepino foram semeadas por copo. Os tratamentos foram irrigados diariamente.

No oitavo dia após a semeadura, foi realizada a contagem do número de plântulas por copo, avaliando-se o índice de germinação. Dezoito dias depois da semeadura, foi feita a avaliação final, que constou da incidência de tombamento de pós-emergência e da medida da altura das plantas (colo até a axila da primeira folha adulta).

Biocontrole de *S. sclerotiorum* em pepineiro com diferentes isolados de *T. vires* - Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 9 x 2 (isolados de *Trichoderma* - TE4, TE8, TH1, TH7, TH10, TH12, TH15 e TH17 + testemunha) x (presença e ausência de *S. sclerotiorum*).

Sacos plásticos com capacidade para 1,5 kg foram preenchidos com 1 kg de substrato comercial Plantimax e dispostos em seis fileiras sobre camalhões na estufa. O

fitopatógeno foi incorporado ao substrato a uma profundidade de 5 cm, usando-se 30 g de inóculo. Após quatro dias, 1 g de pó biológico dos isolados de *T. vires* foi espalhado nas covas e quatro sementes de pepino foram semeadas por saco. Os tratamentos foram irrigados diariamente.

No sexto dia após a semeadura, foi realizada a avaliação da germinação, contando-se o número de plântulas por saco. Depois de 20 dias da semeadura, foi feita a avaliação final do experimento, quanto à incidência de tombamento, o crescimento (medida do colo até a axila da primeira folha verdadeira) e massa seca da raiz, parte aérea e total das plantas.

Análise estatística

Foi realizada análise de variância de todos os experimentos, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Para a análise dos resultados do teste do papel celofane os dados foram transformados em “raiz (X + 1)”.

RESULTADOS

Possíveis antagonistas fúngicos

Com a utilização dos escleródios como iscas, retirou-se do solo um total de cento e doze isolados de possíveis antagonistas fúngicos, de quatro gêneros: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Dos quatro gêneros de fungos encontrados no solo, nos quatro diferentes locais de coleta (horta, jardim, lavoura e estufa) *Trichoderma* apresentou maior número de isolados, com 73, em segundo *Penicillium*, com 33, seguidos por *Fusarium* e *Aspergillus*, com três isolados cada.

Trichoderma spp. foi encontrado nos quatro locais de coleta, em maior quantidade de isolados no solo de lavoura (31,50%), seguido pelo de horta (27,40%), de jardim (24,66%) e de estufa (16,44%).

Experimentos *in vitro*

Dos 112 isolados fúngicos iniciais, sobressaíram-se 17 do gênero *Trichoderma*, demonstrando o melhor desempenho deste gênero no teste *in vitro*. Os isolados de *Penicillium* spp. (inibição de 0 a 48% e um isolado com 77%), *Aspergillus* spp. (inibição de 0 a 1,4%) e *Fusarium* spp. (inibição de 0 a 2,4%) não mostraram bons desempenhos quando comparados aos isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 1).

A variabilidade entre isolados de *Trichoderma* é evidente, pois dos 73 isolados obtidos, oito (11%) não apresentaram qualquer inibição no crescimento micelial do fitopatógeno. Os demais isolados (89%) apresentaram índices variados de inibição micelial de *S. sclerotiorum*.

Dos 17 melhores isolados de *Trichoderma* spp., oito foram selecionados demonstrando os seguintes percentuais de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*: 97,8% para TH12 e TH1; 97,8% para TE4 e TE8; 96,4% para TH10; 95,8% para TH7 e TH17; 95,4% para TH15 (Tabela 1). Os isolados de *Trichoderma* spp. com melhor desempenho em antibiose foram os retirados do solo de horta e de estufa.

A eficácia *in vitro* dos oito isolados antagonistas selecionados na técnica do papel celofane foi confirmada na técnica de confrontação direta com *S. sclerotiorum*, pois todos os isolados obtiveram nota 5 (100% de controle), demonstrando que os mesmos possuem outras habilidades no biocontrole do fitopatógeno, além da antibiose. Pode-se ressaltar que todos os escleródios formados pelo fitopatógeno foram parasitados pelos isolados de *Trichoderma*, apresentando modificações na consistência (amolecimento) e perda de viabilidade.

Os oito isolados de *Trichoderma* spp. selecionados nos testes *in vitro*, foram identificados com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, considerando-se a coloração da colônia (em meio BDA) e a morfologia dos conidióforos, fiálides e conídios, com base na descrição de Bisset (1991), como *Trichoderma (Gliocladium) virens* (Miller, Giddens, and Foster) von Arx.

Biocontrole de *S. sclerotiorum* em pepineiro cultivado em substrato autoclavado e não autoclavado

Quanto à germinação das sementes de pepino, não houve interação entre os três fatores: isolados de *Trichoderma*

virens, presença ou ausência do fitopatógeno e autoclavagem ou não do substrato. Encontrou-se significância apenas com relação à presença ou ausência de *S. sclerotiorum*. A emergência em tratamentos com *S. sclerotiorum* foi menor (47%) do que nos tratamentos sem o fitopatógeno (85%).

O tombamento de mudas foi de apenas 7,7% no tratamento testemunha, com *S. sclerotiorum*, em substrato não autoclavado. No restante, tanto em substrato autoclavado como não autoclavado não ocorreu tombamento de pós-emergência.

Quanto à altura do pepineiro, o resultado da análise de variância mostrou interação significativa entre os três fatores: isolados de *T. virens*, presença ou ausência de *S. sclerotiorum* e autoclavagem ou não do substrato. Encontraram-se diferenças significativas no crescimento do pepineiro com os diferentes isolados de *T. virens* em substrato autoclavado e não autoclavado, na presença ou ausência de *S. sclerotiorum*. Com exceção do substrato não autoclavado e inoculado com *S. sclerotiorum*, as plantas dos demais tratamentos tratadas com o isolado TH7 apresentaram a maior altura, embora, por vezes, não significativamente diferente da testemunha ou de outros isolados. Por outro

TABELA 1 - Antagonismo *in vitro*, pelo teste do papel celofane, de diferentes isolados de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum*. Santa Maria, RS

| Antagonista* | Inibição (cm)** | Antagonista* | Inibição (cm)** | Antagonista* | Inibição (cm)** |
|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| TH12 | 4,89a*** | TJ2 | 3,54 fghijk | TH8 | 1,84rst |
| TH1 | 4,89a | TL2 | 3,49ghijk | TL12 | 1,56stu |
| TE4 | 4,89a | TL7 | 3,46hijk | TH9 | 1,49tu |
| TE8 | 4,89a | TJ14 | 3,34hijkl | TL18 | 1,42tuv |
| TH10 | 4,82ab | TJ5 | 3,31hijkl | TH4 | 1,40tuv |
| TH7 | 4,79ab | TJ10 | 3,29hijkl | TL19 | 1,20uvw |
| TH17 | 4,79ab | TL8 | 3,12ijklm | PH5 | 1,11uvw |
| TH15 | 4,77ab | TJ17 | 3,11ijklm | TL11 | 1,11uvw |
| TH16 | 4,62abc | TL14 | 3,11ijklm | TL9 | 1,07uvw |
| TJ6 | 4,53abcd | TJ12 | 3,05jklmn | TJ8 | 1,05uvw |
| TE3 | 4,52abcd | TL5 | 2,86klmno | TJ15 | 0,95vwx |
| TH2 | 4,52abcd | TE2 | 2,75lmnop | TJ4 | 0,79wxy |
| TH14 | 4,49abcd | TL17 | 2,73lmnop | TH5 | 0,71xyz |
| TE12 | 4,49abcd | TH19 | 2,72lmnop | TH3 | 0,44yz |
| TE11 | 4,39abcde | TL23 | 2,52mnopq | TL6 | 0,36z |
| TL21 | 4,29abcdef | TL4 | 2,47mnopqr | TL20 | 0,30z |
| TE7 | 4,24abcdefg | TE9 | 2,46mnopqr | TE1 | 0,24z |
| TJ11 | 3,99bcdefgh | TH6 | 2,42nopqr | PE7 | 0,19z |
| TJ18 | 3,89cdefgh | PJ3 | 2,39nopqr | FE1 | 0,12z |
| PH1 | 3,86cdefghi | TE5 | 2,38nopqr | TJ3 | 0,12z |
| TH13 | 3,74defghij | TE10 | 2,28opqr | PJ4 | 0,11z |
| TL10 | 3,68efghij | TH18 | 2,11pqrs | PL3 | 0,09z |
| TL15 | 3,61fghij | TE6 | 1,96qrst | AJ2 | 0,07z |
| TJ1 | 3,57fghijk | TJ16 | 1,94qrst | PH11 | 0,07z |
| TL1 | 3,54 fghijk | TL13 | 1,93qrst | TESTEM | 0,00z |
| | | | | &*** * | 0,00z |

*PH - *Penicillium* spp. Horta; TH - *Trichoderma* spp. Horta; PJ - *Penicillium* spp. Jardim; TJ - *Trichoderma* spp. Jardim; AJ - *Aspergillus* spp. Jardim; PL - *Penicillium* spp. Lavoura; TL - *Trichoderma* spp. Lavoura; PE - *Penicillium* spp. Estufa; TE - *Trichoderma* spp. Estufa; FE - *Fusarium* spp. Estufa.

** Distância (cm) entre as bordas de dois micélios de *S. sclerotiorum* colocados em bordas opostas na placa de Petri.

*** Médias seguidas com mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

**** Foram suprimidos 38 isolados por apresentarem a mesma média da testemunha.

lado, alguns isolados reduziram a altura de plantas, como o isolado TH15, exceto no substrato autoclavado com *S. sclerotiorum* (Tabela 2).

De um modo geral, na presença de *S. sclerotiorum*, as plantas apresentaram menor crescimento do que na ausência do fitopatógeno, tanto em substrato autoclavado como em substrato não autoclavado, embora não apresentassem sintoma de mofo branco. A autoclavagem do substrato interferiu positivamente no crescimento das plantas (Tabela 2).

Biocontrole de *S. sclerotiorum* em pepineiro com diferentes isolados de *T. virens*

Quanto à germinação, não houve diferenças significativas entre os diferentes isolados de *T. virens* na ausência ou presença de *S. sclerotiorum*.

Quanto ao tombamento de pós-emergência, nenhum dos tratamentos com *T. virens* apresentou a doença, enquanto que a testemunha, com *S. sclerotiorum*, apresentou 20% de “damping-off”.

Não houve diferença significativa entre os diferentes isolados de *T. virens*, mas observou-se menor altura de plantas na presença (5,27 cm) do que na ausência (7,59 cm) do fitopatógeno, confirmando os resultados do experimento anterior.

Quanto à massa seca das plantas, não se encontraram diferenças significativas entre os diferentes isolados de *T. virens*, mas tratamentos sem *S. sclerotiorum* apresentaram a maior massa seca de raízes, parte aérea e total (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Pelo método de iscas obtiveram-se quatro gêneros fúngicos (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*), sendo que estes já haviam sido anteriormente encontrados parasitando escleródios de *S. sclerotiorum*, tais como: *T. viride* (Nasser *et al.*, 1994), *T. koningii* Oudemans (Illipronti & Machado, 1993; Nasser *et al.*, 1994), *T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. polysporum* (Link : Fr.) Rifai (Illipronti & Machado, 1993); *Fusarium* spp. (Jones & Watson, 1969; Hoes & Huang, 1975), *F. merismoides* Corda, *F. graminearum* Schwabe, *F. lateritium* Ness : Fries, *F. episphaeria* (Tode) WC Snyder & HN Hans (Nasser *et al.*, 1994) e *F. solani* (Martius) Saccardo (Illipronti & Machado, 1993); *Aspergillus flavus* Link : Fr. e *A. sydowii* (Bainier & Sartori) Thom & Church (Illipronti & Machado, 1993; Nasser *et al.*, 1994); *Penicillium* spp. (Adams & Ayers, 1979).

Pode-se observar que, embora os diferentes isolados fúngicos tenham sido retirados dos escleródios de *S. sclerotiorum*, apenas alguns foram selecionados no teste de antibiose como potenciais agentes de biocontrole do fitopatógeno.

Na seleção *in vitro*, os melhores isolados fúngicos foram do gênero *Trichoderma* o que vem ao encontro dos resultados apresentados por Zazzerini & Tosi (1985) em pesquisa de seleção de isolados fúngicos ao *S. sclerotiorum*.

A eficácia de isolados de *Trichoderma* com relação ao fitopatógeno *S. sclerotiorum* na técnica do papel celofane foi demonstrada por Silva (1997), o qual observou que isolados de *T. viride* e *T. harzianum* foram efetivos quanto à inibição micelial do referido patógeno (80 a 100%). O mesmo foi encontrado por Ethur *et al.* (2001) onde foram selecionados quatro de 12 isolados de *Trichoderma* spp. que inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* de 95 a 100%.

A efetividade de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum*, utilizando-se a técnica de confrontação direta, foi demonstrada anteriormente (Zazzerini & Tosi, 1985; Barros *et al.*, 1987; Silva, 1997; Ethur *et al.*, 2001), sem, no entanto, haver menção à espécie em estudo. No confronto direto do agente de biocontrole com o fitopatógeno, além da antibiose já observada no teste do papel celofane, devem ter ocorrido outras ações antagônicas, como o hiperparasitismo e a competição.

Os isolados de *T. virens* selecionados nos testes *in vitro* foram efetivos quanto ao tombamento de mudas causado por *S. sclerotiorum*, o qual é um patógeno causador de “damping-off” de pré e pós-emergência em muitas culturas, inclusive no pepineiro (Cardoso, 1994). Em casa de vegetação, Menendez & Godeas (1998) observaram que na

TABELA 2 - Altura (cm) das plantas de pepineiro (*Cucumis sativus*) (cm) em substratos autoclavado e não autoclavado, na ausência ou presença de *Sclerotinia sclerotiorum*, em tratamentos com diferentes isolados de *Trichoderma virens*. Santa Maria, RS

| Isolado de <i>Trichoderma virens</i> | Subst. autoclavado | | Subst. não autoclavado | |
|--------------------------------------|--|--|--|--|
| | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Ausência | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Presença | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Ausência | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Presença |
| Testemunha | 9,12 ab A* | 4,68 b B | 6,67 b A | 5,07 a B |
| TH1 | 7,59 bc A | 4,07 bc B | 6,67 b A | 3,08 b B |
| TH7 | 9,16 a A | 6,41 a B | 7,64 a A | 2,72 b B |
| TH10 | 8,61 ab A | 3,91 bc B | 3,04 c A | 2,92 b A |
| TH12 | 7,64 abc A | 5,92 a B | 3,25 c A | 3,08 b A |
| TH15 | 6,47 c A | 5,77 a B | 3,38 c A | 1,37 d B |
| TH17 | 7,78 abc A | 2,89 d B | 3,66 c A | 2,09 c B |
| TE4 | 8,87 ab A | 3,55 cd B | 6,83 b A | 2,60 bc B |
| TE8 | 8,22 ab A | 4,79 b B | 6,37 b A | 2,57 bc B |

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha, dentro de substrato autoclavado e não autoclavado, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

TABELA 3 - Massa seca de raiz, parte aérea e total (g), dos pepineiros (*Cucumis sativus*), na presença ou ausência de *Sclerotinia sclerotiorum*. Santa Maria, RS

| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | Massa seca (g) | | |
|---------------------------------|----------------|-------------|---------|
| | Raiz | Parte aérea | Total |
| Ausência | 0,037 a* | 0,167 a | 0,197 a |
| Presença | 0,026 b | 0,096 b | 0,118 b |

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

presença de *T. harzianum* o tombamento de mudas de soja [*Glyxine max* (L.) Merril] causado por *S. sclerotiorum* foi de 20%, enquanto na ausência deste o tombamento foi de 60%. Já Huang *et al.* (2000) observaram controle de 16 a 30% de *S. sclerotiorum* em plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), por um isolado de *T. virens*.

A ação de isolados de *T. virens* contra patógenos de solo ocorre de acordo com Wilhite *et al.* (2001) devido a interações antagônicas, dentre elas, a liberação do antibiótico gliotoxina (antibiose) e sideróforos para a aquisição de ferro (competição). *Trichoderma virens* é efetivo contra “damping-off” causado por *S. sclerotiorum* (Huang *et al.*, 2000) e *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* Kühn (Lumsden & Locke, 1989), mas não há constatações dessa espécie controlando “damping-off” em pepineiro no Brasil.

Com relação aos agentes de biocontrole, além da efetividade quanto ao controle do fitopatógeno, precisa-se levar em consideração alguns fatores como a sua interferência no crescimento e/ou desenvolvimento das plantas. Nesse trabalho, alguns isolados de *T. virens* utilizados não interferiram no crescimento dos pepineiros, e outros interferiram negativa ou positivamente no primeiro experimento, mas o mesmo não se confirmou no segundo, no qual nenhum isolado interferiu no desenvolvimento das plantas. Melo (1996), utilizando duas linhagens mutantes de *T. koningii* hiperprodutoras de celulase e antagônicas a *S. sclerotiorum*, observou aumento na emergência e no peso seco dos pepineiros.

A variabilidade entre os isolados de *Trichoderma* spp., quanto a interferência no crescimento de vegetais, consiste, principalmente, na produção de metabólitos secundários e na sua capacidade de ser competitivo na rizosfera. Ousley *et al.* (1993) demonstraram esta variabilidade quando utilizaram um isolado de *Trichoderma* produtor de viridiol que interferiu negativamente na germinação de alface (*Lactuca sativa* L.) e outros isolados produtores de ácidos graxos e glicerol que atuaram positivamente no crescimento de trigo (*Triticum aestivum* L.). Além da variabilidade entre isolados de *Trichoderma* spp., pode-se encontrar, também, diferenças na ação destes, dependendo da temperatura, umidade e tipo de solo.

Observou-se que o crescimento das plantas, no geral, foi maior em substrato autoclavado, podendo ser devido à modificação química ocorrida pela esterilização do mesmo. Do mesmo modo, Windham *et al.* (1986) encontraram aumento na emergência de plântulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) em solo autoclavado, assim como de peso seco de raiz e parte aérea.

O controle biológico, através da introdução de antagonistas, pode ser considerado uma alternativa viável para o controle de fungos de solo como *S. sclerotiorum*. Isolados de *Trichoderma* spp. selecionados em testes *in vitro* e *in vivo* são considerados excelentes agentes de biocontrole e possuem a vantagem de serem inócuos ao ser humano (Melo, 1996) e não causarem impacto negativo no meio ambiente (Patricio *et al.*, 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.B. & AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69:896-899. 1979.
- APARECIDO, C.C. & FIGUEIREDO, M.B. Antagonismo de *Trichoderma viride* a dois diferentes fungos de solo patogênicos ao feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Biológico* 61:17-21. 1999.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Minnesota. Burgess Publishing Company. 1998.
- BARROS, I.B.I., COSTA, C.P. & MELO, I.S. Avaliação do potencial antagônico de *Trichoderma* sp. em relação a *Sclerotinia minor*. Anais, 3ª Reunião Anual sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, São Paulo, SP. 1987.
- BELL, D.K., WELLS, H.D. & MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382. 1982.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachybasium. *Canadian Journal of Botany* 69:2373-2417. 1991.
- CARDOSO, J.E. Mofo branco. In: Sartorato, A. & Rava, C.A. (Eds.) Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília. EMBRAPA-SPI. 1994. pp.111-122.
- DURMAN, S., MENENDEZ, A. & GODEAS, A. Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* *in vitro* y como biocontrolador del damping-off de plantas de tomate en invernadero. *Revista Argentina de Microbiología* 31:13-18. 1999.
- ETHUR, L.Z., CEMBRANEL, C.Z. & SILVA, A.C.F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. *Ciência Rural* 31:885-887. 2001.
- GHINI, R. Método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagônicos a *Botrytis cinerea*. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA. 1989.
- GOSEN, B.D., RIMMER, S.R. & HOLLEY, J.D. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 85:1206. 2001. (Note).
- HANNUSCH, D.J. & BOLAND, G.J. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of White mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Phytopathology* 86:156-162. 1996.
- HOES, J.A. & HUANG, H.C. *Sclerotinia sclerotiorum*: viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology* 65:1431-1432. 1975.
- HUANG, H.C., BREMER, E., HYNES, R.K. & ERICKSON, R.S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold by dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 18:270-276. 2000.
- ILLIPRONTI JR., R.A. & MACHADO, J.C. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. *Fitopatologia Brasileira* 18:162-166. 1993.
- JONES, D. & WATSON, D. Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a phytopathogenic fungus. *Nature* 224:287-288. 1969.
- LI, G.Q., HUANG, H.C. & ACHARYA, S.N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 28:11-18. 2003.
- LUMSDEN, R.D. & LOCKE, J.C. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. *Phytopathology* 79:361-366. 1989.

- MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patógenos de Plantas 4:261-295. 1996.
- MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) Controle biológico. Jaguariúna. EMBRAPA. 1998. pp.17-66.
- MENENDEZ, A.B. & GODEAS, A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). Mycopathologia 142:153-160. 1998.
- NASSER, L.C.B., BARRON, G., SUTTON, J.C. & NAPOLEÃO, R. Fungos associados com esclerócios de *Sclerotinia sclerotiorum* coletados em áreas de feijoeiro irrigado nos cerrados. Fitopatologia brasileira 19:331. 1994. (Resumo)
- OUSLEY, M.A., LYNCH, J.M. & WHIPPS, J.M. Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. Microbial Ecology 26:277-285. 1993.
- PATRICIO, F.R.A., KIMATI, H. & BARROS, B.C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. Summa Phytopathologica 27: 223-229. 2001.
- PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathology 69: 875-880. 1979.
- RAI, J.N. & SAXENA, V.C. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of white rot disease. Plant and soil 43:509-513. 1975.
- SILVA, A.C.F. Uso de radiação gama para obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai. e *T. viride* Pers. Fr. com capacidade melhorada no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. (Tese de Doutorado) São Paulo. Universidade de São Paulo. 1997.
- SILVA-RIBEIRO, R.T., TERMIGNONI, C., DILLON, A.J.P. & HENRIQUES, J.A.P. Produção de hidrolases por cinco linhagens de *Trichoderma* spp. frente ao fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, e o controle biológico da podridão do colo da alface (*Lactuca sativa*). Genetics and Molecular Biology 22:423.1999. (Resumo)
- ZAZZERINI, A. & TOSI, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology 34:415-421. 1985.
- WILHITE, S.E., LUMSDEN, R.D. & STRANEY, D.C. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. Applied and Environmental Microbiology 67:5055-5062. 2001.
- WINDHAM, M.T., ELAD, Y. & BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 76:518-521. 1986.