



Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja

Antagonism of Trichoderma harzianum to Sclerotium rolfsii in common bean and soybean crops

Ana Carolina Vasconcelos Auler¹, Daniel Diego Costa Carvalho², Sueli Corrêa Marques de Mello^{3*}

Resumo - Os fungicidas sintéticos embora sejam eficientes no controle de fungo fitopatogênicos, apresentam potencial efeito tóxico à saúde humana e ao meio ambiente. Nesse contexto, o controle biológico tem sido utilizado como alternativa para reduzir os prejuízos causados por *Sclerotium rolfsii* em diversas culturas de importância econômica no Brasil. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho estudar o potencial de 23 isolados de *Trichoderma harzianum* provenientes de solo de Cerrado como agente de controle biológico de *S. rolfsii*, importante patógeno nas culturas do feijoeiro e soja. A ação antagonista dos isolados foi verificada por meio do pareamento de culturas sob três temperaturas (22°C, 25°C e 28°C) e em experimentos conduzidos em casa de vegetação, com as culturas de feijoeiro e soja. Os isolados CEN155, CEN158, CEN169, CEN170, CEN194 e CEN197 destacaram-se quanto à inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii*, nas três temperaturas empregadas nos experimentos *in vitro*, ocupando pelo menos 66% da superfície do meio em placa de Petri (90 mm) e também na supressão *in vivo* de *S. rolfsii* nos experimentos com as duas culturas em casa de vegetação, proporcionando percentual médio de plantas sadias acima de 88%, aos 15 dias após as inoculações de patógeno e antagonistas no solo.

Palavras-chave - *Glycine max*. *Phaseolus vulgaris*. Podridão radicular. Controle biológico.

Abstract - Although synthetic fungicides have been efficient for controlling phytopathogenic fungi, these products present potential toxic effect to the human health and to environment. In this context, the biological control has been used as an alternative to reduce losses caused by *Sclerotium rolfsii* in several crops of economic importance in Brazil. Therefore, the objective of this work was to study 23 isolates of *Trichoderma harzianum* obtained from Cerrado soils as biological control agent against *S. rolfsii*, an important soil-borne pathogen of bean and soybean crops. The antagonism of the isolates was verified by dual culture assays (at 22°C, 25°C and 28°C) and *in vivo* experiments carried out in greenhouse, using common bean and soybean plants. The isolates CEN155, CEN158, CEN169, CEN170, CEN194 and CEN197 were able to inhibit the mycelial growth of *S. rolfsii* in the three temperatures employed in the dual culture assays, colonizing at least 66% of the Petri dish surfaces and were also effective for the *in vivo* controlling of *S. rolfsii* on bean and soybean crops, affording average value (%) of healthy plants over 88%, at 15 days after soil inoculations with pathogen and antagonists.

Key words - *Glycine max*. *Phaseolus vulgaris*. Root rot. Biological control.

*Autor para correspondência

Enviado para publicação em 15/04/2013 e aprovado em 19/10/2013

¹Bióloga, Prédio de Controle Biológico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil, carolauler@yahoo.com.br

²Professor DES IV, Laboratório de Fitopatologia, Universidade Estadual de Goiás, Rodovia GO 330, km 241, Anel Viário, Setor Universitário, Ipameri, GO, Brasil, daniel.carvalho@ueg.br

³Pesquisadora A, Prédio de Controle Biológico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil, sueli.mello@embrapa.br

Introdução

O fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. é responsável por podridões do colo e raízes, murcha e tombamento de plântulas, em inúmeras espécies economicamente importantes, dentre as quais, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (BOSAH *et al.*, 2010). Trata-se de um patógeno de difícil controle, pois forma escleródios de cerca de 1 mm de diâmetro, de cor branca a castanha, que lhe confere a capacidade de sobreviver por longos períodos no solo em condições adversas (YAQUB; SHAHZAD, 2011). Além do controle cultural, a aplicação de fungicidas é empregada para o controle de *S. rolfsii* (ADANDONON *et al.*, 2006). Apesar da conhecida efetividade dos fungicidas sintéticos, estes produtos apresentam potencial efeito tóxico à saúde humana e ao meio ambiente (CARVALHO *et al.*, 2011a; CARVALHO *et al.*, 2011b). Nesse contexto, existe demanda em se pesquisar métodos alternativos e menos agressivos ao meio ambiente para o manejo de *S. rolfsii*.

O controle biológico tem sido utilizado como alternativa para reduzir os prejuízos causados por *S. rolfsii* em culturas como feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e soja, uma vez que muitas espécies de fungos e bactérias são relatadas como antagonistas a esse patógeno (ADANDONON *et al.*, 2006; MISHRA *et al.*, 2011). Além disso, o interesse pelo controle biológico vem aumentando nos últimos anos, em resposta à crescente preocupação com o uso de agrotóxicos (LOUZADA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2011b).

Os fungos do gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) são oportunistas, simbioses de plantas, fortes competidores no ambiente do solo, constituem fontes de enzimas degradadoras de parede de outros fungos, são, também, importantes produtores de antibióticos e parasitas de fungos fitopatogênicos (KUMAR *et al.*, 2012). Tais características são fundamentais para o sucesso desses organismos como agentes de biocontrole (LORITO *et al.*, 1993).

Um programa de controle biológico deve ser baseado na seleção de microrganismos antagonistas, que pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. Os testes *in vitro* apresentam a vantagem de permitir o conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos (ex: antibiose e hiperparasitismo) e facilitar a observação das interações entre o antagonista e o fitopatógeno (LIU *et al.*, 2009; LOUZADA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2011c). Os organismos selecionados podem servir como fonte de genes para transformação de outros isolados de agentes de controle biológico, ou para o desenvolvimento de formulações eficazes para o controle biológico de *S. rolfsii* em campo (YAQUB; SHAHZAD, 2011).

Mediante o exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial de isolados de *T. harzianum* como agentes de biocontrole contra *S. rolfsii* em testes *in vitro* e nas culturas do feijoeiro e soja.

Material e métodos

Obtenção e identificação dos isolados de *Trichoderma harzianum*

Os isolados utilizados no presente estudo foram obtidos a partir de amostras tomadas dos primeiros 5,0 a 7,0 cm do solo. Todas as amostras constituíram-se de 10 sub-amostras, as quais foram misturadas e passadas através de peneira de 2 mm de malha. Em seguida, 10 g de solo foram submetidos à diluição seriada em água esterilizada e, uma alíquota de 0,1 mL das suspensões foi distribuída em placas de Petri (90 mm) contendo meio seletivo TSM - *Trichoderma selective medium* (0,12 g KH_2PO_4 ; 0,26 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,26 g KNO_3 ; 1,0 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 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).

Após sete dias de incubação em temperatura ambiente, as colônias características do gênero foram transferidas para meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e, posteriormente, purificadas a partir de cultura monospórica. Assim, um total de 23 isolados foi obtido a partir de diferentes regiões do estado de Goiás e solos com diferentes tipos de cobertura vegetal (Tabela 1), os quais foram identificados como *T. harzianum*, baseando-se na análise e medições de caracteres micromorfológicos e, empregando-se a chave *online* de identificação de espécies de *Trichoderma* proposta por Samuels *et al.* (2013). Os isolados foram incorporados à coleção de fungos para controle biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. Os códigos de identificação dos isolados na coleção estão listados na Tabela 1 (<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-microbiana/colecoes-de-culturas/colecao-de-microrganismos-para-controle-de-fitopatogenos-e-plantas-daninhas/xxx>).

Avaliação do antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* à *Sclerotium rolfsii*

A avaliação do antagonismo consistiu no emprego da metodologia de cultivo pareado em meio BDA, utilizando-se três temperaturas de incubação (22°C, 25°C e 28°C), as quais contemplam o ótimo de temperatura para patógeno e antagonista e, com fotoperíodo de 24 horas (MUKHERJEE; RAGHU, 1997). Para instalação do experimento, discos de micélio-ágar (5 mm) foram

retirados da zona de crescimento de colônias do patógeno e do antagonista, e opostamente depositados a 10 mm das margens das placas de Petri (90 mm). Após 10 dias de incubação, os isolados de *T. harzianum* foram classificados quanto à capacidade de antagonismo segundo a escala de Bell *et al.* (1982): Nota 1: *T. harzianum* cobre 100% da superfície do meio e coloniza totalmente o patógeno; Nota 2: *T. harzianum* cresce sobre pelo menos 66% da superfície do meio e coloniza parcialmente o patógeno; Nota 3: *T. harzianum* ocupa 50% da superfície do meio sem colonizar o patógeno; Nota 4: Patógeno não colonizado cresce sobre pelo menos 66% do meio; Nota 5: Patógeno cobre 100% da superfície do meio.

Para as análises estatísticas, foi considerado o percentual de colonização das placas de Petri por *T. harzianum*. Os experimentos foram conduzidos duas vezes em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com quatro repetições para cada isolado de *T. harzianum*, para as três temperaturas empregadas.

Ação de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfii* nas culturas de feijoeiro e soja em casa de vegetação

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação climatizada (temperatura de 15-35°C e umidade relativa mantida em 70%). Para tanto, inóculo do patógeno e antagonista, foi produzido em frasco Erlenmeyer (250 mL de capacidade), contendo 15 g de arroz parboilizado, previamente umedecido com água destilada (60% p v⁻¹) e autoclavado (CARVALHO *et al.*, 2011b). Como inóculo de *Trichoderma* e *S. rolfii*, foram utilizados discos (5 mm) de micélio-ágar (3 discos frasco⁻¹), retirados da zona de crescimento de colônias com seis dias em BDA. Os frascos foram mantidos em BOD (Fanem, modelo 347) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante seis dias. Em seguida, vasos (500 g de capacidade) contendo solo previamente autoclavado e adubado a 1,25 g da fórmula 5-25-15 (N-P-K) vaso⁻¹, foram simultaneamente infestados com o patógeno e com os isolados de *T. harzianum*. De cada fungo, utilizaram-se 2,5 g de arroz colonizado vaso⁻¹, ou seja: 2,5 x 10⁹ conídios de *T. harzianum* para cada 500 g de solo e 12 escleródios de *S. rolfii* para cada 500 g de solo. Os inóculos foram uniformemente incorporados ao solo. Após 24 horas do enchimento dos vasos, procedeu-se o semeio (6 sementes vaso⁻¹) das culturas de feijoeiro cv. 'Carioquinha' e soja cv. 'Milena' que constituíram cada uma um experimento, separadamente. Quinze dias após o semeio, procederam-se as avaliações, onde as plantas foram cuidadosamente removidas para observação de raízes e colo da planta lesionadas pelo patógeno e separação destas em: (1) plantas saudáveis (plantas sem necroses e sem lesões nas raízes secundárias e seminais e na região do colo) e (2) plantas doentes (plantas com percentual de radículas

lesionadas em relação ao número total de radículas da planta entre 1 e 10%, acima de 10%, lesões no colo da planta, plantas severamente atrofiadas e plantas mortas), segundo metodologia adaptada de Yaqub e Shahzad (2011). Ambos os experimentos de casa de vegetação foram conduzidos em DIC, com quatro repetições por tratamento (isolado de *T. harzianum*). A unidade experimental foi constituída de um vaso (6 plantas vaso⁻¹). Vasos inoculados apenas com o patógeno (sem antagonista) e inoculados apenas com água foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. O experimento foi repetido para confirmação dos resultados.

Análises estatísticas

Os dados relativos à capacidade de antagonismo *in vitro* e ao percentual de plantas saudáveis dos experimentos de casa de vegetação foram submetidos a análises de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott (P≤0,05), utilizando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Resultados e discussão

De acordo com as avaliações em cultivo pareado do presente trabalho, baseando-se na escala de Bell *et al.* (1982), dos 23 isolados de *T. harzianum* estudados, 13 (CEN140, CEN141, CEN153, CEN154, CEN155, CEN156, CEN158, CEN167, CEN169, CEN170, CEN192, CEN194 e CEN197) apresentaram maior crescimento, ocupando pelo menos 2/3 da superfície do meio (notas ≤ 2), em pelo menos uma das três temperaturas de avaliação. Entretanto, para sete destes (CEN154, CEN155, CEN158, CEN169, CEN170, CEN194 e CEN197), a temperatura de incubação não afetou o potencial de inibição *in vitro* (Tabela 1).

Segundo Bosah *et al.* (2010), o teste de cultura pareada possui grande valor na área de controle biológico de fitopatógenos, pois o alto desempenho neste teste sugere que o isolado avaliado é efetivo quanto a capacidade para a rápida colonização das estruturas do patógeno, ampliando o potencial do isolado para exercer o hiperparasitismo e principalmente, competição por espaço e nutrientes. Vale salientar também que os mecanismos de ação avaliados no teste de cultura pareada, tais como a rápida colonização de um patógeno habitante do solo, podem variar entre isolados da mesma espécie (MARTINS-CORDER; MELO, 1998; CARVALHO *et al.*, 2011c).

Mukherjee e Raghu (1997) relataram temperaturas ótimas para o crescimento de espécies de *Trichoderma* entre 25°C e 30°C, diferentemente do patógeno *S. rolfii*, cuja temperatura ótima está entre 30°C e 35°C. De forma

Tabela 1 - Valores médios do percentual de colonização da superfície das placas de Petri por *Trichoderma harzianum*, aos 10 dias de cultivo pareado com *Sclerotium rolfisii*. Brasília, DF, Brasil, 2011

Isolados de <i>T. harzianum</i>	Origem dos isolados		Colonização das placas de Petri (%) ⁽¹⁾		
	Município	Cobertura vegetal	22°C	25°C	28°C
CEN154	Orizona-GO	Milho	92 aA	100 aA	83 aA
CEN155	Orizona-GO	Milho	92 aA	92 aA	83 aA
CEN158	Goianira-GO	Arroz	92 aA	100 aA	85 aA
CEN169	Rio Verde-GO	Sorgo forrageiro	92 aA	100 aA	100 aA
CEN170	Rio Verde-GO	Milho	100 aA	100 aA	92 aA
CEN194	Goiânia-GO	Cerrado	92 aA	100 aA	100 aA
CEN197	Rio Verde-GO	Sorgo forrageiro	100 aA	83 aA	92 aA
CEN143	Goiânia-GO	Cerrado	46 cA	54 cA	35 cA
CEN188	Goiânia-GO	Cerrado	54 bA	46 cA	50 bA
CEN147	Goiânia-GO	Cerrado	38 cB	13 dA	0 dA
CEN193	Rio Verde-GO	Sorgo forrageiro	46 cB	21 dA	4 dA
CEN196	Rio Verde-GO	Pomar de Goiaba	46 cB	17 dA	8 dA
CEN165	Rio Verde-GO	Pomar de Goiaba	48 cB	0 eA	0 dA
CEN150	Goiânia-GO	Cerrado	54 bB	40 cB	0 dA
CEN166	Rio Verde-GO	Pomar de Goiaba	54 bC	8 eA	35 cB
CEN141	Orizona-GO	Soja	58 bA	100 aB	100 aB
CEN189	Goiânia-GO	Cerrado	58 bB	0 eA	4 dA
CEN191	Rio Verde-GO	Pomar de Goiaba	58 bC	25 dB	4 dA
CEN140	Orizona-GO	Soja	66 bB	34 cA	58 bB
CEN167	Rio Verde-GO	Pomar de Goiaba	66 bB	0 eA	13 dA
CEN192	Rio Verde-GO	Pomar de Goiaba	66 bB	54 cB	25 dA
CEN156	Orizona-GO	Milho	75 aB	62 bA	50 bA
CEN153	Orizona-GO	Milho	92 aB	92 aB	62 bA
C.V. (%)			17,06	25,17	25,16

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

análoga, verificou-se, neste trabalho, um decréscimo do número de isolados de *T. harzianum* com forte atividade antagonista (*T. harzianum* colonizando pelo menos 66% da superfície da placa de Petri), com a elevação da temperatura de incubação, ou seja, 12 isolados (CEN140, CEN167, CEN192, CEN156, CEN153, CEN154, CEN155, CEN158, CEN169, CEN194, CEN170 e CEN197), 9 isolados (CEN141, CEN153, CEN154, CEN155, CEN158, CEN169, CEN194, CEN170 e CEN197) e 8 isolados (CEN141, CEN154, CEN155, CEN158, CEN169, CEN194, CEN170 e CEN197) nos experimentos conduzidos à 22°C, 25°C e 28°C, respectivamente (Tabela 1).

Ainda, em conformidade com os resultados apresentados na Tabela 1, vale salientar o trabalho de Punja (1985), o qual relatou que *S. rolfisii* tende a responder

a temperaturas mais elevadas (entre 27°C e 30°C) com produção de estruturas de resistência (os escleródios), fato que o favorece em termos de sobrevivência. Adicionalmente, deve-se mencionar conformidade com o trabalho desenvolvido por Bosah *et al.* (2010), o qual avaliou o efeito antagonico *in vitro* de *Trichoderma* sp. contra *S. rolfisii* em cultura pareada, em que resultados similares aos da Tabela 1 foram obtidos empregando-se a temperatura de 26±2°C. Assim como no presente trabalho, os supracitados autores justificaram que a faixa de temperatura utilizada foi ideal para o antagonista exercer competição por nutrientes e energia em detrimento do fungo *S. rolfisii*.

Nos experimentos conduzidos com a cultura do feijoeiro, os tratamentos com *T. harzianum*, exceto

CEN143, CEN147, CEN188 e CEN193, foram estatisticamente similares ao controle negativo, cujo solo não foi infestado com o patógeno (e nem com antagonista), apresentando valores médios elevados ($\geq 83\%$) de porcentagem de plantas sadias, aos 15 dias do semeio (Tabela 2). Três dos quatro isolados de pior desempenho

nos experimentos com a cultura do feijoeiro (CEN143, CEN188 e CEN193) também foram inferiores ao controle negativo (solo não infestado com o patógeno) quanto ao percentual de plantas de soja sadias aos 15 dias (Tabela 2). Ainda nos experimentos com soja, CEN154, CEN166, CEN189, CEN192 e CEN196 completaram o grupo de oito isolados com desempenho antagonístico inferior, em relação aos demais isolados de *T. harzianum*.

Tabela 2 - Percentual médio de plantas sadias, atribuídos à ação de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfii*, nas culturas de feijoeiro e soja, em ensaios conduzidos em casa de vegetação. Brasília, DF, Brasil, 2011

Isolados de <i>T. harzianum</i>	Percentual médio de plantas sadias aos 15 dias (%) ^(1, 2, 3)	
	Feijoeiro	Soja
CEN143	67 b	88 b
CEN188	71 b	79 b
CEN193	71 b	58 c
CEN147	79 b	96 a
CEN166	83 a	83 b
CEN192	83 a	88 b
CEN140	88 a	92 a
CEN141	88 a	96 a
CEN153	88 a	100 a
CEN154	88 a	83 b
CEN156	88 a	92 a
CEN191	88 a	100 a
CEN196	88 a	79 b
CEN197	88 a	92 a
CEN150	92 a	92 a
CEN158	92 a	96 a
CEN165	92 a	96 a
CEN167	92 a	92 a
CEN155	96 a	96 a
CEN169	96 a	96 a
CEN170	96 a	100 a
CEN189	96 a	79 b
CEN194	100 a	92 a
<i>Sclerotium rolfii</i>	63 b	46 c
Água	96 a	100 a
C.V. (%)	14,09	11,75

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$);

⁽²⁾Considerando-se o percentual de plantas sadias encontrado em cada vaso (6 sementes vaso⁻¹); cada vaso foi considerado como uma unidade experimental (repetição) de cada tratamento (isolado de *T. harzianum*.); ⁽³⁾Plantas sadias: plantas sem necroses e sem lesões nas raízes secundárias e seminais e na região do colo, segundo metodologia adaptada de Yaqub e Shahzad (2011).

Esses resultados referentes à inibição de *S. rolfii* nos experimentos conduzidos em casa de vegetação, com todos os isolados de *T. harzianum* testados, constitui exemplo raro em programas de controle biológico. Em se tratando da avaliação *in vivo* de isolados com potencial antagonístico, raramente ocorre de se obter na maior parte destes, o alto potencial antagonístico anteriormente visto nos experimentos *in vitro*. Entre os sete isolados, para os quais a temperatura de incubação não afetou o potencial de inibição *in vitro*, apenas CEN154 não se mostrou ativo nos experimentos *in vivo* com plantas de soja; sugerindo a necessidade de se avaliar o antagonismo sob o efeito de uma faixa específica de temperaturas (22°C a 28°C), para seleção de isolados a serem utilizados em testes posteriores, que sejam adequados ao ambiente em que serão utilizados. Para as duas culturas estudadas, a continuação deste trabalho de seleção de isolados efetivos contra *S. rolfii*, poderá ser levada a ensaios de campo com os seis isolados (CEN155, CEN158, CEN169, CEN170, CEN194 e CEN197) que foram ativos nas três temperaturas empregadas nos experimentos *in vitro*, e que também foram ativos nos experimentos *in vivo* com as duas culturas.

O efeito de *Trichoderma* sobre *S. rolfii* em condições de casa de vegetação e campo é bem documentado (ADANDONON *et al.*, 2006; YAQUB; SHAHZAD, 2008; MISHRA *et al.*, 2011). Em conformidade com o nosso estudo, Adandonon *et al.* (2006) verificaram que formulações de *Trichoderma* sp., adicionadas em solo artificialmente infestado por *S. rolfii*, permitiram um máximo de 21% de plantas de feijão caupi atacadas pelo patógeno, em experimentos de casa de vegetação, cujas plantas foram avaliadas até 30 dias após o semeio. Os autores especularam que o tipo de aplicação (tratamento de substrato ou das sementes) pode afetar a eficácia do agente de biocontrole. Salienta-se, ainda, que a aplicação de *Trichoderma* por meio da inoculação de sementes ou tratamento de substrato depende de fatores como temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração, pH e teor de matéria orgânica, os quais influenciam na sobrevivência de *Trichoderma* no solo ou substrato (HOWELL, 2003). Além dos fatores ambientais mencionados anteriormente, os quais interferem no desempenho de um agente de biocontrole, deve-se atentar também para a capacidade do antagonista em reproduzir no

solo ou substrato (MIRANDA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2011b) e outros mecanismos envolvidos no controle biológico de fitopatógenos (antibiose, parasitismo e competição por espaço e nutrientes) que eventualmente possuem. Estes últimos, principalmente o potencial competitivo, possuem como teste mais adequado para avaliação, o crescimento em cultura pareada empregado neste trabalho.

Nesse contexto, uma possível explicação para o alto antagonismo de CEN155, CEN158, CEN169, CEN170, CEN194 e CEN197 contra o fungo *S. rolfsii*, em detrimento dos demais isolados de *T. harzianum*, reside no fato de que o conjunto de mecanismos de controle biológico anteriormente citado, pode variar entre isolados de uma mesma espécie, tanto em experimentos *in vitro* (KUMAR *et al.*, 2012) quanto em experimentos *in vivo* (MIRANDA *et al.*, 2006). Segundo Louzada *et al.* (2009), não há relatos na literatura que informem sobre a perda de diversidade de *Trichoderma* spp. com o uso agrícola contínuo de solos ou mesmo a possível relação de tais interferências com a redução da frequência do antagonismo a patógenos. Além disso, os resultados obtidos nas Tabelas 1 e 2 corroboram com Louzada *et al.* (2009), pois não apresentaram correlação com a origem da amostra ou espécie vegetal cultivada.

A aplicação de *Trichoderma* spp. em condições de campo consiste em prática promissora, uma vez que o controle biológico oferece maior durabilidade, segurança e melhor custo-efetividade do que os fungicidas químicos aplicados no solo (YAQUB; SHAHZAD, 2011; KUMAR *et al.*, 2012). Os agricultores podem usar isolados de *Trichoderma* efetivos contra *S. rolfsii*, almejando reduzir perdas no estande inicial e na produção das culturas do feijoeiro e soja, e como consequência, incrementar os rendimentos.

Conclusão

Os isolados CEN155, CEN158, CEN169, CEN170, CEN194 e CEN197, se destacam na inibição do crescimento de *S. rolfsii*, *in vitro* e também na supressão do patógeno em casa de vegetação nas culturas do feijoeiro e soja.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por uma bolsa de iniciação científica e a Embrapa pelo apoio institucional.

Literatura científica citada

- ADANDONON, A.; AVELING, T. A. S.; LABUSCHAGNE, N.; TAMO, M. Biocontrol agents in combination with *Moringa oleifera* extract for integrated control of *Sclerotium*-caused cowpea damping-off and stem rot. **European Journal of Plant Pathology**, v.115, p.409-418, 2006.
- 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.
- BOSAH, O.; IGELEKE, C. A.; OMORUSI, V. I. *In vitro* microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.12, n.3, p.474-476, 2010.
- CARVALHO, D. D. C.; ALVES, E.; CAMARGOS, R. B.; OLIVEIRA, D. F.; SCOLFORO, J. R. S.; CARVALHO, D. A.; BATISTA, T. R. S. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.28, n.4, p.173-178, 2011a.
- CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A. M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011b.
- CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M. C. Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* and on seeds and growth promotion of common bean in early stages by *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.28-34, 2011c.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- 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, n.1, p.4-10, 2003.
- KUMAR, K.; AMARESAN, N.; BHAGAT, S.; MADHURI, K.; SRIVASTAVA, R. C. Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v.52, n.2, p.137-144, 2012.
- LIU, L. N.; ZHANG, J. Z.; XU, T. Histopathological studies of sclerotia of *Rhizoctonia solani* parasitized by the EGFP transformant of *Trichoderma virens*. **Letters in Applied Microbiology**, v.49, p.745-750, 2009.
- LORITO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; TRONSNO, A.; WOO, S. L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiase. **Phytopathology**, v.83, p.302-307, 1993.
- LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.145-149, 2009.

- 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.
- MIRANDA, M. E. A.; ESTRELLA, A. H.; CABRIALES, J. J. P. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.1823-1830, 2006.
- MISHRA, D. S.; GUPTA, A. K.; PRAJAPATI, C. R.; SINGH, U. S. Combination of fungal and bacterial antagonists for management of root and stem rot disease of soybean. **Pakistan Journal of Botany**, v.43, n.5, p.2569-2574, 2011.
- MUKHERJEE, P. K.; RAGHU, K. Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*. **Mycopathology**, v.139, p.151-155, 1997.
- PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.97-127, 1985.
- 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: 25 de mar. 2013.
- YAQUB, F.; SHAHZAD, S. Effect of seed pelleting with *Trichoderma* spp., and *gliocladium virens* on growth and colonization of roots of sunflower and mung bean by *Sclerotium rolfsii*. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.2, p.947-953, 2008.
- YAQUB, F.; SHAHZAD, S. Efficacy and persistence of microbial antagonists against *Sclerotium rolfsii* under field conditions. **Pakistan Journal of Botany**, v.43, n.5, p.2627-2634, 2011.