



# Sobrevivência de estrutura de resistência de *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em solo tratado biologicamente

## *Survival of resistance structures in Macrophomina phaseolina and Sclerotium rolfsii in a biologically treated soil*

Selma Rogéria Carvalho Nascimento<sup>1\*</sup>, Fernando Henrique Alves Silva<sup>2</sup>, Beatriz Letícia Silva Cruz<sup>3</sup>, Andréa Mirne Macedo Dantas<sup>4</sup>, Márcia Michelle Queiroz Ambrósio<sup>5</sup>, Rosemberg Ferreira Senhor<sup>6</sup>

**Resumo:** O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do fungo *Trichoderma* e do produto Compost Aid<sup>®</sup> *in vitro* e na sobrevivência dos fungos *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* no solo. Os tratamentos foram: Tricobiol<sup>®</sup> a base de *T. harzianum*, Triconemate<sup>®</sup> a base de *T. longibrachiatum* da Biofungi Controle Biológico<sup>®</sup>, *Trichoderma viride* (TR2); *T. harzianum* (T25); *T. koningii* (T15); *T. polysporum* (Sn11) e Compost Aid<sup>®</sup>. A avaliação do antagonismo foi determinada pela nota atribuída à porcentagem de crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. em relação aos fungos fitopatogênicos, bem como a porcentagem de inibição do crescimento dos patógenos em relação ao produto Compost Aid<sup>®</sup>. A sobrevivência de estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos foi avaliada aos 40 dias após a aplicação dos tratamentos, através do plaqueamento em meios de cultura sem- seletivo e BDA. No experimento *in vitro*, em todos os tratamentos com *Trichoderma*, a porcentagem de inibição foi superior a 50%, para ambos os fungos fitopatogênicos. Os produtos comerciais Tricobiol<sup>®</sup> e Triconemate<sup>®</sup> propiciaram as maiores porcentagens de inibição do fungo *S. rolfsii* (62,5%). O produto Compost Aid<sup>®</sup> inibiu 100% e 98,57% do crescimento dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii*, respectivamente. Os tratamentos na forma mix de *Trichoderma* e Tricobiol<sup>®</sup> tiveram a mediana de 100%, enquanto o Triconemate<sup>®</sup> obteve 96% de inibição do crescimento de microesclerócios de *M. phaseolina* recuperados do solo, porém, não inibiram a germinação dos esclerócios de *S. rolfsii*. O produto Compost Aid<sup>®</sup> propiciou a mediana de 100 e 0% do crescimento das estruturas de resistência dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii*, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Trichoderma*. Compost Aid. Patógenos habitantes do solo.

**Abstract:** This aim of this study was to evaluate the effect *in vitro* of the fungus *Trichoderma* and of the product Compost Aid<sup>®</sup>, and on the survival of the fungi phaseolina *Macrophomina* and *Sclerotium rolfsii* in the soil. The treatments were Tricobiol<sup>®</sup> with a *T. harzianum* base, Triconemate<sup>®</sup> with a base of *T. longibrachiatum* from Biofungi Control Biológico<sup>®</sup>, *Trichoderma viride* (TR2); *T. harzianum* (T25); *T. koningii* (T15); *T. Polysporum* (SN11) and Compost Aid<sup>®</sup>. An evaluation of antagonism was determined from the score allotted to the percentage of growth of isolates of *Trichoderma* spp. in relation to the phyto-pathogenic fungi, as well as the percentage inhibition in pathogen growth in relation to the Compost Aid<sup>®</sup> product. The survival of resistance structures in the pathogenic fungi was evaluated 40 days after application of the treatments by plating onto a semi-selective culture medium and BDA. For the experiment *in vitro*, all the treatments with *Trichoderma* produced a percentage inhibition greater than 50% for both phyto-pathogenic fungi. The commercial products Tricobiol<sup>®</sup> and Triconemate<sup>®</sup> gave the greatest percentage inhibition for the fungus *S. rolfsii* (62.5%). The Compost Aid<sup>®</sup> product gave 100% and 98.57% inhibition in the growth of the fungi *M. phaseolin* and *S. rolfsii* respectively. The treatments in the form of a mixture of *Trichoderma* and Tricobiol<sup>®</sup> had a median value of 100%, while Triconemate<sup>®</sup> resulted in a 96% inhibition in the growth of the microsclerotia of *M. phaseolina* recovered from the soil; however none of these treatments inhibited sclerotial germination in *S. rolfsii*. The product Compost Aid<sup>®</sup> resulted in a median of 100% and 0% growth in resistance structures for the *M. phaseolina* and *S. rolfsii* fungi respectively.

**Key words:** *Trichoderma*. Compost Aid. Soil-borne pathogens.

\*Autor para correspondência

Enviado para publicação em 03/09/2015 e aprovado em 07/04/2016

<sup>1</sup>Professora Dra. Titular, Depto. de Ciências Vegetais, UFERSA, Mossoró - RN, Brasil, selma@ufersa.edu.br

<sup>2</sup>Doutorando em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró-RN, Brasil, fernandosilvasr@hotmail.com

<sup>3</sup>Doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Pernambuco, UFPB, Recife-PE, Brasil, beatrizleticia@live.com

<sup>4</sup>Doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil, andrea-mirny@hotmail.com

<sup>5</sup>Professora Dra. Associada I, Depto. de Ciências Vegetais, UFERSA, Mossoró - RN, Brasil, marciamichelle@ufersa.edu.br

<sup>6</sup>Doutor em Fitopatologia, Fazenda Agrícola Famosa, Mossoró - RN, Brasil, berg\_fit@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O controle de patógenos, especialmente os habitantes do solo, através de medidas alternativas e biológicas, pode amenizar os efeitos negativos dos agrotóxicos no ambiente, nos alimentos e na resistência dos patógenos (THAKKAR; SARAFI, 2015). Fungos fitopatogênicos habitantes do solo causam grandes perdas econômicas em várias culturas. Esses fungos podem produzir estruturas de resistência na ausência de seus hospedeiros e/ou de condições climáticas favoráveis que lhes garantem sobrevivência por muitos anos no solo (MICHEREFF *et al.*, 2005). O controle químico para patógenos habitantes do solo muitas vezes pode ser ineficiente e antieconômico, além de causar contaminação do ambiente e a destruição da microflora não alvo (KUMAR *et al.*, 2015).

O fungo *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) é polífago e sua distribuição é mundial, infectando mais de 1800 espécies botânicas, podendo causar tombamento de mudas ou podridão no caule ou nas raízes das plantas hospedeiras (SMML, 2015). A partir de um micélio branco e totonoso, produz esclerócios de 0,8 a 1,8 mm, dependendo das condições de temperatura e umidade, que é a sua estrutura principal de disseminação e sobrevivência (OKEREKE; WOKOCHA, 2007). Outro importante patógeno produtor de estrutura especializada de resistência é *Macrophomina phaseolina* (Tassi). Goid, que forma microesclerócios e causa tombamento de mudas e podridões de raízes e caules em mais de 600 espécies cultivadas e não cultivadas (SMML, 2015), é favorecido principalmente pelo clima quente e seco ou situação de estresse de calor (RADWAN *et al.*, 2014).

O controle biológico para esses fitopatógenos, com o emprego de microrganismos, pode representar uma prática segura e eficiente (DOLEY; JITE, 2012). Dentre os vários agentes de controle biológico, espécies de *Trichoderma* (teliomórfico: *Hypocrea*) têm sido amplamente investigadas e utilizadas devido a sua capacidade de controle de fitopatógenos (VINALE *et al.*, 2008; DOLEY; JITE, 2012; GAJERA *et al.*, 2012). Dentre as espécies, *T. harzianum* e *T. asperellum* são as mais estudadas, além de outras como *T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii*. As espécies desse gênero produzem enzimas líticas que causam degradação das paredes celulares dos fungos que hiperparasitam, sendo a produção dessas enzimas diretamente relacionada com a eficácia no processo de hiperparasitismo (KUMAR *et al.*, 2012).

Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas também estão sendo avaliados quanto à eficácia no controle de fitopatógenos de solo (BETTIOL, 2012). O produto Compost Aid®, conforme informação do fabricante, é um inoculante resultante da mistura de enzimas e bactérias (*Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium*) especialmente selecionadas, que

aceleram o processo de compostagem, de forma natural, convertendo materiais orgânicos em um composto com baixa relação C/N, auxiliando na diminuição da severidade de doenças, cujos patógenos sofrem competição de microrganismos habitantes do solo (BELLOTTE, 2006).

Diante dos efeitos nocivos às culturas hospedeiras e da dificuldade do controle dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii*, objetivou-se avaliar o antagonismo de isolados de *Trichoderma*, bem como o efeito do produto comercial Compost Aid® *in vitro* e na sobrevivência de esclerócios desses patógenos recuperados do solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia e em estufa agrícola do setor de Fitossanidade do Departamento de Ciências Vegetais, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, no período de setembro a outubro de 2013.

Os isolados dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii* foram obtidos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.), respectivamente, com sintomas de podridão de colo e raízes. Realizou-se teste para comprovar a patogenicidade dos fungos.

Para o preparo do inóculo dos fungos utilizados no experimento *in vitro* e produção de esclerócios utilizados no experimento em casa de vegetação, os isolados de *M. phaseolina*, *S. rolfsii* e *Trichoderma* [(Tricobiol® a base de *T. harzianum*, Triconemate® a base de *T. longibrachiatum* da Biofungi Controle Biológico®, *Trichoderma viride* (TR2); *T. harzianum* (T25); *T. koningii* (T15); *T. polysporum* (Sn11)] foram repicados para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, e mantidos a 27±1 °C, no escuro, em estufa tipo B.O.D. durante 6 dias para proporcionar o crescimento fúngico e, posteriormente, serem utilizados nos experimentos.

O experimento *in vitro* foi montado com duas metodologias para avaliar o efeito da inibição dos fungos fitopatogênicos no teste de cultivo pareado e quanto ao produto Compost Aid® (aditivo para compostagem com ingredientes a base de celulase, amilase, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium* da Improcrop®). Primeiramente, o antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. em relação aos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii* foi verificado através do cultivo pareado, segundo metodologia de Dennis; Webster (1971). Os fungos foram repicados a partir de culturas puras (com 6 dias) para placas de Petri de 90 mm, contendo meio de cultura BDA, sendo em cada placa depositados, opostamente, dois discos de 7 mm de diâmetro de meio de cultura contendo os fungos, posicionados a uma distância de 10 mm da borda, sendo um disco dos fungos fitopatogênicos e outro dos isolados antagonistas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e 5 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. As placas de Petri, contendo os fungos, foram mantidas em estufa tipo B.O.D. a temperatura de  $28 \pm 1$  °C, no escuro, durante 5 dias.

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliado utilizando-se escala diagramática, para avaliação dos testes de cultura pareada, proposta por Bell *et al.* (1982), modificada (Figura 1). Considerou-se o isolado antagônico ou eficiente no antagonismo quando a nota foi maior ou igual a 3,0.

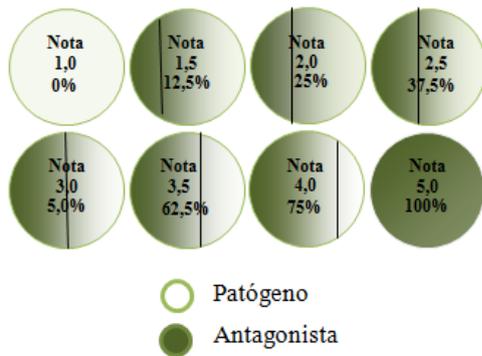


Figura 1 - Escala diagramática para avaliação do teste de culturas pareadas, de acordo com escala proposta por Bell *et al.* (1982), modificada.

Figure 1 - Diagrammatic scale for evaluation of the paired-culture test, as per a scale proposed by Bell *et al.* (1982), modified.

Os dados foram submetidos a análises de variância e as médias das notas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o Assistat, versão 7.7 beta.

Para avaliação da inibição dos fungos fitopatogênicos quanto ao produto Compost Aid®, esse foi incorporado em condições assépticas ao meio de cultura BDA autoclavado, após resfriado a temperatura de  $\pm 50$  °C, na proporção de 25 g.L<sup>-1</sup> de meio de cultura, e recebeu, após a solidificação, um disco de cada fungo fitopatogênico. As testemunhas foram representadas pelas placas contendo meio de cultura BDA, sem adição do produto Compost Aid® e repicadas com os discos de cada um dos fungos.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com dois tratamentos, sendo um deles com e outro sem Compost Aid®, e dois fungos com 5 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

As placas de Petri, contendo os fungos, foram mantidas em estufa tipo B.O.D. a temperatura de  $28 \pm 1$  °C, no escuro, durante 5 dias. Após esse período, foram realizadas

as avaliações da porcentagem de inibição dos fungos fitopatogênicos pelo produto Compost Aid®, através da medição do crescimento micelial das colônias em dois eixos ortogonais, sendo posteriormente calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C.), expressa pela fórmula:  $P.I.C. = [(crescimento da testemunha - crescimento do tratamento) \times 100] \div$  crescimento da testemunha.

Os dados foram submetidos a análises de variância e as médias das notas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o Assistat, versão 7.7 beta.

No experimento em casa de vegetação, os inóculos do fungo *Trichoderma* spp. foram produzidos em meio de cultura BDA, durante 5 dias, a  $27 \pm 1$  °C, no escuro, em estufa tipo B.O.D. Os microesclerócios de *M. phaseolina* foram obtidos em substrato areno-orgânico contido em frascos de 1000 mL de capacidade, com 500 mL de substrato em cada frasco, previamente autoclavado três vezes, em intervalos de 24 h durante 1 h a 120 °C. O substrato consistiu-se de três partes de esterco de curral curtido, uma parte de areia lavada e 2% de aveia (V/P), onde foram adicionados 20 mL de água destilada para cada 1000 mL de substrato. Em seguida, foram depositados, em cada frasco, 5 discos de BDA de 7 mm de diâmetro contendo micélio do fungo *M. phaseolina*, os quais foram retirados das bordas das colônias com 5 dias de crescimento em estufa tipo B.O.D., a  $27 \pm 1$  °C, no escuro. Posteriormente, os frascos repicados com o fungo *M. phaseolina* foram mantidos em estufa tipo B.O.D., a  $27 \pm 1$  °C, no escuro, durante 25 dias para o desenvolvimento dos microesclerócios do fungo. Para a produção de esclerócios de *S. rolfssii*, o fungo foi repicado para meio de cultura BDA, e as placas foram mantidas em estufa tipo B.O.D. a  $27 \pm 1$  °C, no escuro, por 25 dias.

Após esse período, o substrato contendo microesclerócios de *M. phaseolina* foi colocado em tecido sintético (náilon) em forma de bolsa, cerca de 10 mL do substrato por bolsa, e os esclerócios de *S. rolfssii*, cerca de 400 esclerócios, também foram amarrados em forma de bolsas, sendo enterradas a profundidade de 10 cm, em vasos com capacidade de 3L, preenchidos por solo. Para facilitar a remoção e localização, as bolsas foram amarradas com linha náilon e receberam etiquetas que ficaram na superfície do solo. O solo utilizado é da classe (Latosolo Vermelho), textura arenosa, obtido de área não agricultada e coletado a 2 m de profundidade. Em seguida, foram colocados, em cada vaso, os tratamentos biológicos, correspondendo à suspensão de conídios ( $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>) de Tricobiol®, Triconemate®, Mix de *Trichoderma* (TR2, T25, T15 e Sn11) e 25 g de Compost Aid®, diluído em 1000 mL de água destilada. Foram distribuídos 200 mL de suspensão de cada tratamento por vaso, contendo as bolsas enterradas com o inóculo dos fungos fitopatogênicos em vasos separados (25 vasos para cada fungo fitopatogênico). Cada tratamento teve 5 repetições, sendo cada repetição representada por

um vaso. Os vasos testemunhas, com as bolsas de cada fungo, receberam 200 mL de água destilada por vaso. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

As bolsas enterradas no solo foram coletadas, após 40 dias, e desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1,2%, durante um minuto, e submetidas a três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada, para remoção do resíduo de hipoclorito de sódio. Com auxílio de uma pinça, 10 porções de, aproximadamente, 0,6 g do substrato contido nas bolsas foram transferidas para placas de Petri, contendo os meios de cultura semi-seletivo para *M. phaseolina*, sendo: BDA com Rifampicina 100 mg.L mais fungicida propamocarb a 1 mL.L<sup>-1</sup>; (Previcur N<sup>®</sup> 72,2% p.a.), segundo Nascimento *et al.* (2014). Para a avaliação da sobrevivência dos esclerócios de *S. rolfsii*, foram transferidos 10 esclerócios contidos nas bolsas, previamente desinfestadas, para o meio de cultura BDA com 50 mg.L<sup>-1</sup> de tetraciclina.

As placas de Petri, contendo o inóculo de ambos patógenos, foram mantidas em estufa tipo B.O.D., no escuro, a 28 ± 1 °C,

**Tabela 1** - Antagonismo de isolados de *T. harzianum* (Tricobiol<sup>®</sup>), *T. longibrachiatum* (Ticonemate<sup>®</sup>), *T. viride* (TR2); *T. harzianum* (T25); *T. koningii* (T15), *T. polysporum* (Sn11) aos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii* e porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii* pelo produto biológico comercial Compost Aid<sup>®</sup> *in vitro*

**Table 1** - Antagonism in isolates of *T. harzianum* (Tricobiol<sup>®</sup>), *T. longibrachiatum* (Ticonemate<sup>®</sup>), *T. viride* (TR2); *T. harzianum* (T25); *T. koningii* (T15), *T. polysporum* (SN11) to the fungi *M. phaseolina* and *S. rolfsii*, and the percentage inhibition *in vitro* of mycelial growth in the fungi *M. phaseolina* and *S. rolfsii* by the commercial biological product Compost Aid<sup>®</sup>

Tratamentos	<i>M. phaseolina</i>	<i>S. rolfsii</i>
	Antagonismo**	
Tricobiol <sup>®</sup>	4,4 a*	4,2 a
Ticonemate <sup>®</sup>	4,4 a	4,2 a
TR2	4,2 a	3,6 ab
T25	4,6 a	3,8 ab
T15	4,4 a	3,0 b
Sn11	4,2 a	3,4 ab
CV%	11,83	12,09
Compost Aid <sup>®</sup>	Porcentagem de inibição	
	100	98,57

\* Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\*\*Média de notas de 1 a 5.

\*Mean values followed by the same letter in a column do not differ statistically at 5% probability by Tukey's test.

\*\*Mean values for the scores from 1 to 5.

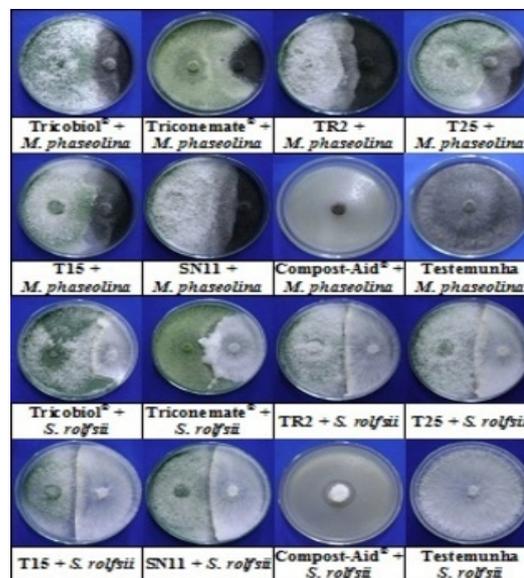
por 6 dias, para proporcionar a germinação dos microesclerócios de *M. phaseolina* e esclerócios *S. rolfsii* plaqueados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri (2 fungos fitopatogênicos e 5 tratamentos incluindo testemunha), sendo que, de cada tratamento, foram repicados 5 bolsas, totalizando 125 placas para cada fungo. A avaliação foi realizada por meio das médias das porcentagens de inibição da germinação dos esclerócios dos fungos.

Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade através do programa PAST version 2.17b (HAMMER *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

O experimento *in vitro* mostrou antagonismo de todos os isolados de *Trichoderma* frente aos fitopatógenos, *M. phaseolina* e *S. rolfsii*, obtendo-se porcentagem de inibição acima de 50%, nota igual ou maior a 3,0 (Tabela 1; Figura 2). Não houve diferença estatística entre os tratamentos



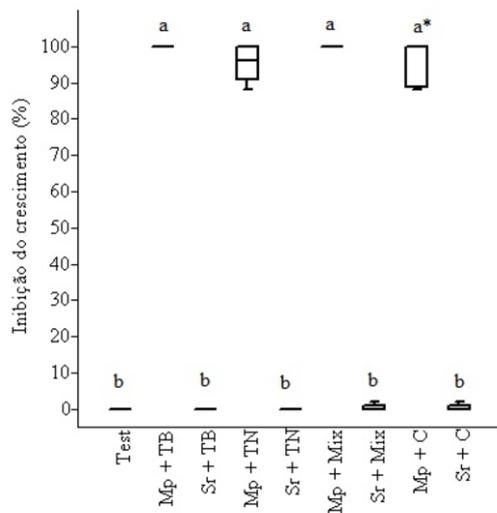
**Figura 2** - Antagonismo avaliado pelo teste de cultura pareada de isolados de *T. harzianum* (Tricobiol<sup>®</sup>), *T. longibrachiatum* (Ticonemate<sup>®</sup>), *T. viride* (TR2); *T. harzianum* (T25); *T. koningii* (T15), *T. polysporum* (Sn11) aos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii* e inibição do do crescimento micelial dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii* pelo produto biológico comercial Compost Aid<sup>®</sup> *in vitro*.

**Figure 2** - Antagonism evaluated by the paired-culture test in isolates of *T. harzianum* (Tricobiol<sup>®</sup>), *T. longibrachiatum* (Ticonemate<sup>®</sup>), *T. viride* (TR2); *T. harzianum* (T25); *T. koningii* (T15), *T. polysporum* (SN11) to the fungi *M. phaseolina* and *S. rolfsii*, and the inhibition *in vitro* of mycelial growth in the fungi *M. phaseolina* and *S. rolfsii* by the commercial biological product Compost Aid<sup>®</sup>.

com *Trichoderma* em relação ao fungo *M. phaseolina*. Os produtos comerciais Tricobiol® e Triconemate® proporcionaram as maiores notas (4,2) de antagonismo para o fungo *S. rolfsii*, não diferindo entre si e dos tratamentos TR2 (*T. viride*), T25 (*T. harzianum*) e Sn11.

Sn 11 (*T. polysporum*) com as notas 3,6; 3,8 e 3,4 respectivamente. *T. koningii* (T15) proporcionou a menor nota (3,0) de antagonismo do fungo *S. rolfsii*, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos TR2, T25 e Sn11 (Tabela 1). O produto Compost Aid® inibiu 100% do crescimento do fungo *M. phaseolina* e 98,57% do *S. rolfsii* (Tabela 1).

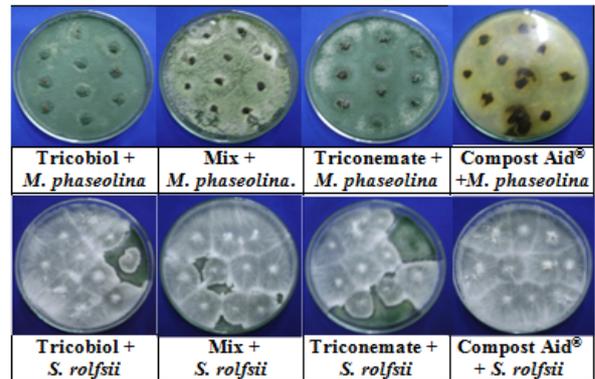
No experimento de inibição do crescimento das estruturas de resistência, os tratamentos com *Trichoderma*, tanto na forma de mistura de isolados (mix) como na forma comercial Tricobiol®, a mediana de inibição foi de 100%, e para o Triconemate®, a mediana foi de 96% não diferindo estatisticamente entre si quanto à inibição do fungo *M. phaseolina*. Porém, esses produtos não inibiram a germinação dos esclerócios de *S. rolfsii*. O produto Compost Aid® propiciou a mediana de 100 e 0% do crescimento das estruturas de resistência dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii*, respectivamente (Figuras 3 e 4).



**Figura 3** - Box plot mostrando a inibição do crescimento das estruturas de resistência dos fungos *M. phaseolina* (Mp) e *S. rolfsii* (Sr.) recuperados do solo, submetido aos tratamentos com Tricobiol® (TB), Triconemate® (TN), mix de *Trichoderma* (Mix) e Compost Aid® (C).

\*Medianas seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

**Figure 3** - Box plot showing growth inhibition in resistance structures of the *M. phaseolina* (Mp) and *S. rolfsii* (Sr.) fungi, recovered from soil subjected to treatments with Tricobiol® (TB) Triconemate® (TN), and a mixture of *Trichoderma* (Mix) and Compost Aid® (C). \*Median values followed by the same letters do not differ by Kruskal-Wallis test.



**Figura 4** - Inibição do crescimento das estruturas de resistência dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii* recuperados do solo, submetido aos tratamentos com Tricobiol® e Triconemate®, mix de *Trichoderma* e Compost Aid®.

**Figure 4** - Growth inhibition in resistance structures of the *M. phaseolina* and *S. rolfsii* fungi recovered from soil subjected to treatments with Tricobiol® and Triconemate®, and a mixture of *Trichoderma* and Compost Aid®.

## DISCUSSÃO

Testes de antagonismo *in vitro* são importantes no processo de seleção de isolados para biocontrole, pois fornecem informações sobre a eficiência e a variabilidade dos isolados quanto à capacidade de colonização das estruturas do patógeno e o potencial de hiperparasitismo e competição por espaço e nutrientes, bem como a suscetibilidade de patógenos aos respectivos agentes, em condições controladas. Esses testes também foram utilizados por outros autores para selecionarem os isolados mais eficientes e, posteriormente, utilizá-los em estudos *in vivo* no controle biológico (AULER *et al.*, 2013). O efeito antagonístico *in vitro* de várias espécies de *Trichoderma* foi também verificado por outros autores quanto aos fungos *S. rolfsii* (BOSAH *et al.*, 2010; AULER *et al.*, 2013) e *M. phaseolina* (GAJERA *et al.*, 2012), obtendo resultados tão promissores quanto os do presente estudo.

O produto Compost-Aid® compreende uma mistura de bactérias com alta atividade decompositora, contribuindo com a redução da severidade de doenças cujo inóculo pode sobreviver no solo, conforme verificado por Bellotte (2006), que comprovou que a decomposição mais acelerada das folhas de citros diminuiu a doença provocada por *Guignardia citricarpa*. Os resultados no presente estudo comprovaram, também, haver efeito direto desse produto sobre os esclerócios dos fungos fitopatogênicos avaliados, fato ainda não comprovado por outros trabalhos.

Dentre os microrganismos presentes na composição do Compost Aid®, o *Lactobacillus plantarum*, que é encontrado em alimentos e fermentações para produção de alimentos, apresentam propriedades inibidoras de outras bactérias e fungos devido à produção de substância bactericida chamada plantaricina, que pode ter sido a responsável pela inibição dos fungos fitopatogênicos avaliados em nossos estudos e também verificado nos estudos de Roselló *et al.* (2013) acerca do controle de *Erwinia amylovora*. A bactéria *Enterococcus faecium*, também presente no Compost Aid®, produz ácido láctico que pode inibir bactérias e fungos fitopatogênicos, tendo sido recomendado para aumentar a segurança alimentar em pós-colheita (FHOULA *et al.*, 2013).

O *Bacillus subtilis* é uma das bactérias mais estudadas no controle biológico, dentre os componentes do Compost Aid®, sendo que, sua atividade *in vitro*, demonstra ação antifúngica a um amplo espectro de patógenos devido à secreção de metabólitos que produzem alterações estruturais nas células fúngicas. O efeito do *B. subtilis*, no controle de patógenos habitantes do solo como *M. phaseolina*, está associado à inibição do crescimento micelial desses, através da produção de compostos orgânicos voláteis (GACITÚA *et al.*, 2009).

Em condições de campo, o *B. subtilis* colonizam eficientemente a rizosfera, o que garante um efeito biopesticida e biofertilizante, aumentando a disponibilidade de nutrientes do solo, promovendo o crescimento das plantas e aumentando sua resistência a fitopatógenos, além do controle de fitopatógenos (ORBERÁ *et al.*, 2004). Estudos mostraram que isolados de *B. Subtillis*, obtidos de solo da rizosfera, apresentaram potencial de controle a patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Exserohilum turcicum* e, seus efeitos consistem da produção de quitinase, efetiva na degradação da parede

celular de patógenos que tem quitina na sua composição (DEVKOTA *et al.*, 2011). O produto Compost Aid® foi eficiente na inibição do crescimento dos microesclerócios do fungo *M. phaseolina* recuperado das bolsas enterradas no solo, o que comprova a eficiência dos microrganismos constituintes de sua composição.

*Trichoderma* spp. são efetivos agentes biocontroladores de vários fungos fitopatogênicos habitantes do solo, incluindo *M. phaseolina* (GAJERA *et al.*, 2012) e *S. rolfsii* (BAGWAN, 2011). Segundo Vinale *et al.* (2008), o biocontrole exercido pelo fungo *Trichoderma* está relacionado com a produção de vários metabólitos, enzimas e por mecanismos como competição por nutrientes, o que pode ter contribuído com as respostas do presente estudo em relação ao fungo *M. phaseolina*, porém não foram eficientes na inviabilização dos esclerócios de *S. rolfsii*. A deficiência nesse caso pode estar relacionada com as condições bióticas e abióticas do solo, o que pode levar a variação do nível de controle biológico de um patógeno (ISAIAS *et al.*, 2014).

## CONCLUSÕES

Todos os tratamentos *in vitro* com *Trichoderma* e Compost Aid® proporcionam inibição dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii*;

Os tratamentos Tricobiol®, Triconemate®, mix de *Trichoderma* e Compost Aid® inibem 100% do crescimento dos microesclerócios do fungo *M. phaseolina* recuperados do solo;

Todos os tratamentos com *Trichoderma* e com o produto Compost Aid® não inibem a germinação dos esclerócios de *S. rolfsii* recuperados do solo.

## LITERATURA CIENTÍFICA CITADA

AULER, A. C. V.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n. 3, p. 359-365, 2013.

BAGWAN, N. B. Evaluation of biocontrol potential of *Trichoderma* species against *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. **International Journal of Plant Protection**, v. 4, n. 1, p.107-111, 2011.

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.

BELLOTTE, J. A. M. **Controle da mancha preta dos frutos cítricos mediante manejo cultura**. 2006, 63p. Dissertação (Mestrado – Produção Vegetal)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

BETTIOL, W. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Wagner Bettiol... [et. al.]. – Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p. — (Documentos/Embrapa Meio Ambiente; 88). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/66628/1/Doc-88-1.pdf>> Acesso em: 25 ago. 2015.

- 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.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of *Trichoderma*, III hyphal interaction. **Transactions British Mycological Society**, v. 57, p. 363-369, 1971.
- DEVKOTA, H. K.; MAHARJAN, B. L.; BARAL, B.; SINGH, A.; YAMI, K. D. *In vitro* Screening of Antifungal Activity of Rhizospheric Bacteria and Possible Role of Chitinase in Antifungal Activity. **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 12, p. 304-311, 2011.
- DOLEY, K.; JITE, P. K. *In vitro* Efficacy of *Trichoderma viride* Against *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 4, n. 4, p. 39-44, 2012.
- FHOULA, I.; NAJJARI, A.; TURKI, Y.; JABALLAH, S.; BOUDABOUS, A.; OUZARI, H. Diversity and Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Rhizosphere of Olive Trees and Desert Truffles of Tunisia. **BioMed Research International**, 14 p, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/405708>>. Acesso em 01 nov. 2013.
- GACITÚA, S. A.; VALIENTE, C. F.; DÍAZ, K., P.; HERNÁNDEZ, J. C.; URIBE, M. M.; SANFUENTES E. V. Identification and biological characterization of isolates with activity inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (tassi) goid. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 69, n. 4, p. 526-533, 2009.
- GAJERA, H. P.; BAMBHAROLIA, R. P.; PATEL, S. V.; KHATRANI, T. J.; GOALKIYA, B. A. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: Evaluation of Coiling and Cell Wall Degrading Enzymatic Activities. **Journal Plant Pathology Microbiology**, v. 3, n. 7 p. 149, 2012.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST – **Palaeontological statistic**, v. 25, n. 07, p. 2009, 2001.
- ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagonística e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.
- KUMAR, K.; AMARESAN, N.; BHAGA, S.; MADHUR, 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.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. 1 Ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 398 p.
- NASCIMENTO, S. R. C.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SILVA, F. H. A.; GUIMARÃES, L. M. S. Meios de cultura semi-seletivos para *Macrophomina phaseolina*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 4, p. 334-337, 2014.
- ORBERÁ, T. M.; SERRAT, M. J.; ORTEGA, E. Potential applications of *Bacillus subtilis* strain SR/B-16 for the control of phytopathogenic fungi in economically relevant crops. **Biotechnologia Aplicada**, v. 31, n. 1, p. 13-17, 2014.
- OKEREKE, V. C.; WOKOCHA, R. C. *In vitro* growth of four isolates of *Sclerotium rolfsii* Sacc in the humid tropics. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 16, p. 1879-1881, 2007.
- RADWAN O., ROUHANA L. V, HARTMAN GL, KORBAN S. S. Genetic mechanisms of host-pathogen interactions for charcoal rot in soybean. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 617-629, 2014.
- ROSELLÓ, G.; BONATERRA, A.; FRANCÉS, J.; MONTESINOS, L.; BADOSA, E; MONTESINOS, E. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 3, p. 621-633, 2013.
- SMML **Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host Database**. Disponível em: [http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/new\\_frameFungusHostReport.cfm](http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/new_frameFungusHostReport.cfm). Acesso em: 12 agost. 2015.
- THAKKAR, A.; SARAF, M. Development of microbial consortia as a biocontrol agents for effective management of fungal disease in *Glycine max* L. **Archives of Phytopathology and Protection**, v. 48, n. 6, p. 459-474, 2015.
- 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.