



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE IPAMERI  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal



**Controle de *Cladosporium herbarum* e promoção de  
crescimento do feijoeiro pelo emprego de *Trichoderma  
harzianum***

M  
E  
S  
T  
R  
A  
D  
O

Ipameri-GO  
2014

GESIANE RIBEIRO GUIMARÃES

**Controle de *Cladosporium herbarum* e promoção de crescimento do feijoeiro pelo emprego de *Trichoderma harzianum***

Orientador: Prof. Dr. Daniel Diego Costa Carvalho

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Goiás – UEG, Unidade Universitária de Ipameri como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de MESTRE.

Guimaraes, Gesiane Ribeiro.

Controle de *Cladosporium herbarum* e promoção de crescimento do feijoeiro pelo emprego de *Trichoderma harzianum*.  
2014.  
54 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Diego Costa Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás –  
Unidade Universitária de Ipameri, 2014.

Bibliografia.

1. Fisiologia vegetal 2. Controle biológico. 3. Patologia de sementes.

I. Título.



Unidade Universitária de Ipameri  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal  
Rodovia GO 330, Km 241, Anel Viário, 75780-000 Ipameri-GO  
www.ppgpv.ueg.br e-mail: ppgpv.ipameri@gmail.com  
Fone: (64)3491-5219



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** "CONTROLE DE *Cladosporium herbarum* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO PELO EMPREGO DE *Trichoderma harzianum*"

**AUTORA:** Gesiane Ribeiro Guimarães

**ORIENTADOR:** Daniel Diego Costa Carvalho

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL, pela comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANIEL DIEGO COSTA CARVALHO  
Universidade Estadual de Goiás/Ipameri-GO

Prof. Dr. MILTON LUIZ DA PAZ LIMA  
Instituto Federal Goiano/Câmpus Urutal

Prof. Dr. VITOR CORRÊA DE MATTOS BARRETTO  
Universidade Estadual de Goiás/Ipameri-GO

Data da realização: 24 de julho de 2014.

Dedico a meus pais Geraci e Ana Maria e aos meus irmãos Giselle, Geraci Junior, que sempre me apoiaram com todo seu amor e carinho e me estimularam a nunca desistir dos meus objetivos. E ao meu orientador pelo esforço e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus,

Aos meus pais e irmãos pelo amor, carinho e compreensão que sempre me apoiaram e me incentivaram a não desistir dos meus ideais. A Universidade Estadual de Goiás Unidade de Ipameri em especial o Laboratório de Fitopatologia, agradeço não só a formação acadêmica, mas também a oportunidade e todo apoio para realização desta dissertação. Quero agradecer de modo especial ao meu orientador Daniel Diego, por sua atenção, apoio, otimismo, confiança e amizade.

Obrigada por esta oportunidade de aprender e contribuir com a Ciência.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Aos professores do curso que contribuíram para minha formação profissional: Ednaldo Cândido Rocha, Fábio Santos Matos, Itamar Rosa Teixeira, Luciane Madureira de Almeida, Márcio da Silva Araújo, Flávio Gonçalves de Jesus, Simério Carlos Silva Cruz, e Daniel Diego Costa Carvalho.

Ao Professor Dr. Milton Luiz da Paz Lima por tem me apoiado.

A vocês que dedicaram seu tempo e sua experiência, o meu muito obrigado e eterno reconhecimento.

De igual forma as técnicas de laboratório Joseliana (Josi), Maria e a secretária da Pós Aparecida de Fátima pela presteza em auxiliar-me, ou simplesmente pela excelente companhia.

Obrigada especialmente aos eternos amigos Luiz Paulo, Fagner, Mirella e a todos que torceram por mim.

Obrigada também aos amigos que passaram pelo Laboratório de Fitopatologia.

À minha amiga Gaby, por sempre somar entusiasmos e alegrias.

Obrigada por tantos momentos de alegria e amizade. Sentirei muito a falta de vocês!

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 Importância sócio-econômica do feijão comum.....	01
1.2 Patógeno de armazenamento: <i>Cladosporium</i> sp.....	01
1.3 Emprego do fungo <i>Trichoderma</i> no controle de fitopatógenos em sementes....	02
1.4 <i>Trichoderma</i> como promotores do crescimento de plantas.....	02
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>04</b>
<b>Capítulo I.....</b>	<b>05</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>06</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>06</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>07</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>08</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>08</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>12</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>12</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo II.....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>25</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo III.....</b>	<b>28</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>29</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>29</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>

<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
	<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>39</b>
	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>

## RESUMO

O fungo *Cladosporium* está associado às sementes de feijão comum durante o armazenamento, sendo capaz de infligir danos na germinação e vigor. O objetivo deste trabalho foi avaliar cinco isolados de *Trichoderma harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) no controle de *Cladosporium herbarum* e na promoção do crescimento inicial de plântulas de feijão comum. Para tanto, (1) realizou-se a caracterização micromorfológica de *C. herbarum* encontrado em sementes de feijão comum cv. 'Pérola' no município de Ipameri, Goiás, Brasil, (2) avaliou-se a capacidade hiperparasítica e o efeito *in vitro* de metabólitos voláteis (MV) e não voláteis termoestáveis (MNVT) dos antagonistas sobre *C. herbarum* em placas de Petri, (3) avaliou-se o efeito dos antagonistas e seus metabólitos autoclavados sobre *C. herbarum* em sementes (2 mL de suspensão a  $2,5 \times 10^8$  conídios  $100 \text{ g}^{-1}$  de sementes e 2 mL de metabólitos autoclavados  $100 \text{ g}^{-1}$  de sementes, respectivamente) e (4) avaliou-se o crescimento e a biomassa das plântulas de feijão comum mediante tratamento das sementes com metabólitos autoclavados (MA) e suspensão de conídios (SC) dos antagonistas, nas mesmas doses especificadas anteriormente. Após observações das características micromorfológicas dos conídios, verificou-se que estes possuíam  $7,2 - 10,4 \times 3,6 - 4,2 \text{ }\mu\text{m}$  ( $8,1 \times 4,0 \text{ }\mu\text{m}$ ) e aliado a demais características, o fungo foi identificado como *C. herbarum*. Com relação ao controle, verificou-se o hiperparasitismo de *T. harzianum* sobre *C. herbarum* em microscópio de luz a partir da visualização das estruturas dos fungos em amostras retiradas da zona de confronto dos mesmos. Além disso, nos testes com MV, o isolado CEN288 inibiu em 59% o crescimento *in vitro* de *C. herbarum*, enquanto que para MNVT todos os isolados foram similares entre si, inibindo entre 29 e 40% o crescimento do patógeno. Com relação ao uso da SC no tratamento de sementes, todos os isolados de *T. harzianum* proporcionaram controle do patógeno, o qual variou de 67 a 77%. Ainda no tratamento de sementes, os MA dos isolados CEN289 e CEN290 proporcionaram o melhor controle (75 e 73%, respectivamente). Com relação aos experimentos avaliando o potencial de *T. harzianum* na promoção do crescimento do feijoeiro, os isolados CEN289 e CEN290, respectivamente, diferiram dos demais quanto ao comprimento das raízes (12,57 e 13,31 cm, controle: 8,94 cm) e do caule (9,10 e 8,77 cm, controle: 7,05 cm) nos experimentos utilizando a SC. Além disso, CEN289 e CEN290, respectivamente, foram os que proporcionaram maior biomassa total no experimento com SC (127,45 e 117,91 g; controle: 95,23 g) e MA (133,43 e 128,13; controle: 70,39 g). Plântulas oriundas de sementes tratadas com CEN289 e CEN290, apresentaram intenso acúmulo de biomassa e crescimento vegetativo vigoroso, podendo alcançar a maturidade em menor espaço de tempo.

**Palavras-chaves:** Fisiologia vegetal; Controle biológico; Patologia de sementes.

## ABSTRACT

The fungus *Cladosporium* is associated with common bean seeds during storage, being able to inflict damage on germination and vigor. The objective of this study was to evaluate five isolates of *Trichoderma harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 and CEN316) in control of *Cladosporium herbarum* and promoting early seedling growth of common bean. For this purpose: (1) it was carried out a micromorphological characterization of *C. herbarum* found on seeds of common bean cv. 'Perola', Ipameri, Goiás, Brazil; (2) it was evaluated the parasitic capacity and in vitro effect of volatile (vm) and thermostable non-volatile metabolites (tnvm) from antagonists against *C. herbarum* in Petri dishes; (3) it was evaluated the effect of the antagonists and its metabolites (vm and tnvm) on seeds contaminated with *C. herbarum* (2 mL suspension at  $2.5 \times 10^8$  conidia  $100 \text{ g}^{-1}$  seeds and 2 mL of tnvm  $100 \text{ g}^{-1}$  seeds, respectively) and; (4) it was evaluated the growth and biomass of common bean seedlings by seed treatment with autoclaved metabolites (AM) and conidia suspension (CS) of antagonist, at the same doses previously specified. After micromorphologic observations of the characteristics of conidia, it was found that they had  $7.2$  to  $10.4 \times 3.6$  to  $4.2 \text{ }\mu\text{m}$  ( $8.1 \times 4.0 \text{ }\mu\text{m}$ ) and combined with other characteristics, the fungus was identified as *C. herbarum*. Concerning the control, it was founded the hiperparasitism of *T. harzianum* on *C. herbarum* in a light microscope from the visualization of the fungi structures from samples taken from the same confrontation area. Furthermore, in tests with vm, CEN288 inhibited in 59% the in vitro growth of *C. herbarum*, while for tnvm all isolates were similar, ranging from 29 to 40% of pathogen growth inhibition. Concerning the use of cs in the seed treatment, all isolates of *T. harzianum* gave control of the pathogen, which ranged 67 to 77%. Still in seed treatment, am of CEN289 and CEN290 provide the better control (75 and 73 %, respectively). Regarding the experiments evaluating the potential of *T. harzianum* in promoting the growth of bean, CEN289 and CEN290, respectively, differ from the others such the length of roots (12.57 and 13.31 cm, control: 8.94 cm) and stem (9.10 and 8.77 cm, control: 7.05 cm) in experiments using sc. Besides, CEN289 and CEN290, respectively, provided the highest total biomass in the experiment with CS (127.45 and 117.91 g, control: 95.23 g) and AM (133.43 and 128.13, control: 70.39 g). Seedlings grown from seeds treated with CEN289 and CEN290 showed intense accumulation of biomass and vigorous vegetative growth, reaching maturity in the shortest.

**Key-words:** Plant physiology; Biological control; Seeds pathology.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Importância sócio-econômica do feijão comum

O feijão consiste em uma importante fonte de proteínas na alimentação humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais (Alwathnani et al., 2012). No Brasil, o feijão é um dos componentes básicos da dieta alimentar da população e importante fonte de proteína para as classes economicamente menos favorecidas (Barbosa e Gonzaga, 2012). Estima-se que a produção total de feijão no Brasil, na safra de 2013/2014 tenha sido da ordem 2.899,1 toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento, 2014). O fungo *Cladosporium* está associado com sementes de feijão durante o armazenamento e é capaz de provocar danos na germinação e vigor, especialmente em sementes não tratadas (Carvalho et al., 2011a).

Os agrotóxicos, a exemplo dos fungicidas, têm contribuído para ganhos na obtenção dos alimentos e das fibras necessárias à população mundial, apesar de estarem relacionados ao aumento dos custos da produção, contaminação de alimentos e do meio ambiente (Hoagland, 1996; McFayden, 1998) e à crescente resistência dos microrganismos fitopatogênicos aos produtos sintéticos (Amaral e Bara, 2005). Nesse contexto, existe uma crescente valorização dos produtos da natureza, considerados confiáveis e seguros. As grandes companhias, visando atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente, vêm procurando novas moléculas detentoras de atividade biológica e, com esse objetivo, examinando os elementos que constituem a biodiversidade, como plantas e microrganismos (Ferreira et al., 1998).

### 1.2 Patógeno de armazenamento: *Cladosporium* sp.

Os fungos de armazenamento são considerados iniciadores da deterioração das sementes, contando ou não com a colaboração de alguns fatores, como pequenas aberturas nas superfícies das sementes causadas por algumas espécies de insetos e choques mecânicos resultados das práticas agrícolas durante a colheita, transporte e armazenamento, esses fatores somados as condições de umidade e temperatura promovem uma porta de entrada e um ambiente favorável para o desenvolvimento e o crescimento do propágulo (Ito et al., 2003). Assim, o gênero *Cladosporium*, por sua vez, é comum em sementes de feijão durante o armazenamento e podem causar prejuízos na germinação e no vigor, quando as sementes não são tratadas (Ito et al., 2003; Zucchi e Melo, 2009). O fungo *Cladosporium* sp. pode causar manchas no tegumento, resultando em um aspecto indesejável e conseqüente depreciação dos lotes de sementes (Marino e Mesquita, 2009). Vários são os fungos que são transmitidos por sementes tais como: *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp e *Penicillium* sp, os quais

foram detectados também como agentes fitopatogênicos de plântulas de cereais (Mahamune e Kakde, 2011).

### **1.3 Emprego do fungo *Trichoderma* no controle de fitopatógenos em sementes**

Espécies do gênero *Trichoderma*, compreendem um grande número de variantes de fungos com importância principalmente como agentes de controle biológico. *Trichoderma* é um habitante natural do solo encontrado em todos os ecossistemas, colonizador de raízes; tem a capacidade de empregar diversos mecanismos que resultam no biocontrole de doenças tais como antibiose, micoparasitismo, competição e indução de resistência; sendo que mais de um desses mecanismos é utilizado para exercer o biocontrole de doenças (Consolo et al., 2012). Assim, este microrganismo se destaca pelo rápido crescimento, esporulação profusa, capacidade de crescimento em diferentes substratos e tolerância a compostos nocivos (bioremediação) (Harman et al., 2004).

O uso de sementes tratadas com fungicidas sintéticos e agentes de biocontrole ocasiona redução da disseminação de fitopatógenos para áreas indenidas e reduz a transmissão de doenças via semente no campo, contribuindo para uma maior densidade de plantas (Pereira et al., 2013). Além disso, o fungo *Trichoderma* spp. destaca-se como importante agente de biocontrole pela microbiolização de sementes. Para exemplificar, pode-se citar o trabalho de Diniz et al. (2006), que verificou que este antagonista tem mostrado melhor atuação contra patógenos habitantes do solo e menos especializados como, por exemplo, *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium* sp., pois, como também é um habitante do solo, suas características de antagonismo são melhor expressas neste ambiente (Saito et al., 2009). Isso ocorre porque o fungo *Trichoderma* spp. compete com fungos fitopatogênicos pelos exsudatos liberados por sementes no processo de germinação destas (Harman et al., 2004).

### **1.4 *Trichoderma* como promotores do crescimento de plantas**

Além dos efeitos de *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos, certos isolados podem estimular o desenvolvimento de plantas (Harman et al., 2004). Em experimentos de casa de vegetação e de campo, a habilidade de *T. harzianum* 'T-22' e *T. atroviride* 'P1' em promover o crescimento de plantas de alface, tomate e pimentão foi confirmada por Vinale et al. (2004). Esses efeitos diretos no crescimento das culturas são obtidos porque, além de colonizar a rizosfera das plantas, as espécies desse fungo também podem produzir substâncias promotoras do crescimento das plantas (Mathivanan et al., 2005), e ainda solubilizar nutrientes da rizosfera, tornando-os disponíveis às raízes (Harman, 2000). Referindo-se de forma particular ao presente projeto pode-se citar os trabalhos de Hoyos-Carvajal et al. (2009)

e Carvalho et al. (2011a), os quais verificaram que o fungo *Trichoderma* é comercializado em vários países como princípio ativo de inoculantes de efeito biofúngida e promotor de desenvolvimento de plantas de feijoeiro.

## 2 OBJETIVOS

- 1 - Estimar a incidência e realizar a identificação da espécie de *Cladosporium* sp. encontrado em sementes de feijão comum cv. 'Pérola'.
- 2 - Avaliar a capacidade hiperparasítica e o efeito de metabólitos voláteis e não voláteis de cinco isolados de *Trichoderma harzianum* no controle *in vitro* de *Cladosporium herbarum*, bem como avaliar o crescimento do agente de biocontrole em diferentes temperaturas.
- 3 - Avaliar o controle de *C. herbarum* em sementes e promoção de crescimento de plântulas de feijão por suspensão de conídios e metabólitos autoclavados de *T. harzianum*.

## Capítulo I

**Incidência e caracterização morfológica de *Cladosporium herbarum* em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. 'Pérola'**

## RESUMO

O fungo *Cladosporium* está associado às sementes de feijão comum durante o armazenamento, sendo capaz de infligir danos na germinação e vigor. O objetivo deste trabalho foi estimar a incidência e realizar a caracterização micromorfológica de *Cladosporium herbarum* encontrado em sementes de feijão comum cv. 'Pérola' no município de Ipameri, Goiás, Brasil. Para tanto, as sementes provenientes de plantios localizados em áreas experimentais da Universidade Estadual de Goiás (UEG), campus Ipameri, foram submetidas a análise sanitária pelo método *blotter test* e examinadas em estereomicroscópio para confecção de lâminas semi-permanentes para observação microscópica, mediante remoção de micélio e estruturas fúngicas encontradas sobre o tecido vegetal infectado. Após observações das características culturais e mensuração dos conídios, verificou-se que estes possuíam dimensões (comprimento x largura) de: 7,2 – 10,4 x 3,6 – 4,2 µm (8,1 x 4,0 µm). Estas características indicaram o fungo tratar-se de *C. herbarum*, o qual ocorreu com incidência de 59,5% nas sementes naturalmente contaminadas. As preparações em ácido láctico contendo estruturas e esporos do fungo foram depositadas no Laminário Fitopatológico da UEG. A cultivar de feijão 'Pérola' proporciona alta incidência de *C. herbarum* nas sementes.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*, patologia de sementes, taxonomia de fungos.

## ABSTRACT

The fungus *Cladosporium* has been associated to the common bean seeds during storage, causing losses in the vigor and germination. The objective of this study was to estimate the incidence and perform micromorphological characterization of *Cladosporium herbarum* found on seeds of common bean cv. 'Pérola' in Ipameri, Goiás state, Brazil. Therefore, common bean seeds from plantations located at experimental areas of the Universidade Estadual de Goiás (UEG), Ipameri, were submitted to health analysis by the blotter test method and, moreover, they were examined under a stereomicroscope aiming to make semi-permanent slides mounting for microscopic observation by removing fungal mycelia and structures found on the infected plant tissue. After observations of the cultural characteristics and measurement of the conidia, it was verified that they had dimensions (length x width) of 7.2 to 10.4 x 3.6 to 4.2 µm (8.1 x 4.0 µm). These characteristics indicated that the fungus was *C. herbarum*, which occurred with an incidence of 59.5% on naturally contaminated seeds. Preparations on lactic acid, containing the structures and fungal spores were deposited in the slide collection of plant pathogens of the UEG. The common bean 'Pérola' provide high incidence of *C. herbarum* on the seeds.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, seeds pathology, fungi taxonomy.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro é originária das Américas, com centros de origem e domesticação na mesoamérica (México-Guatemala) e na zona leste dos Andes. Seu cultivo foi traçado há mais de 7000 anos entre os nativos do Peru, sugerindo a seleção da espécie para a agricultura (Kintschev, 2013). O gênero *Phaseolus* contém mais de uma centena de espécies, mas apenas *P. vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. acutifoli* L. e *P. lunatus* L. são cultivadas comercialmente (Zimmermann e Teixeira 1988). Assim, o feijão consiste em uma importante fonte de proteínas na alimentação humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais (Alwathnani et al., 2012). No Brasil, o feijão é um dos componentes básicos da dieta alimentar da população (Barbosa e Gonzaga, 2012). Estima-se que a produção total de feijão no Brasil, na safra de 2012/2013 tenha sido da ordem 2.899,1 toneladas (CONAB, 2013). Apesar da grande produção verificada, a produtividade média brasileira é baixa, cerca de 850 a 970 kg ha<sup>-1</sup>, decorrente de fatores negativos tais como a ocorrência de várias doenças (Pereira et al., 2004, Barbosa e Gonzaga 2012, CONAB, 2013). Isto se deve, em parte, ao fato de o feijoeiro ser suscetível a vários microrganismos fitopatogênicos, responsáveis por perdas significativas em lavouras, chegando a inviabilizar a cultura em determinadas regiões e épocas de plantio (Melo et al., 2006). Cerca de 60 doenças atacam a cultura do feijão, sendo 31 causadas por fungos e as demais por vírus, bactérias e nematóides (Garcia et al., 2002).

Entre estes, o fungo *Cladosporium* está associado às sementes de feijão comum durante o armazenamento, sendo capaz de infligir danos na germinação e vigor, especialmente em sementes não tratadas (Carvalho et al., 2011). Possuindo ocorrência notória em grãos de feijão, espécies do gênero *Cladosporium* ocorrem nas sementes principalmente no hilo, onde podem ser observados, conidióforos altos, escuros, eretos, ramificados irregularmente no ápice; conídios escuros, com nenhum a três septos, variáveis em forma e tamanho, formando cadeias frequentemente ramificadas, globosos ou subglobosos com 3,0 a 4,5 µm de diâmetro e, colônias de coloração cinza ou oliva (RAS, 2009).

Portanto, conhecer os patógenos ocorrentes nas sementes das plantas cultivadas é importante, pois somente o correto diagnóstico do patógeno em questão é que vai fornecer subsídios para a posterior adoção de medidas de manejo do fungo nas sementes e no aumento da produtividade. Para tanto, é necessária a correta caracterização e posterior identificação do patógeno (Vida et al., 2004). Embora seja comum nas sementes do feijoeiro, há uma escassez de trabalhos científicos abordando o fungo *Cladosporium* sp. em sementes. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar a incidência e identificar o isolado de *Cladosporium herbarum* encontrado em sementes de feijão comum cv. 'Pérola'.

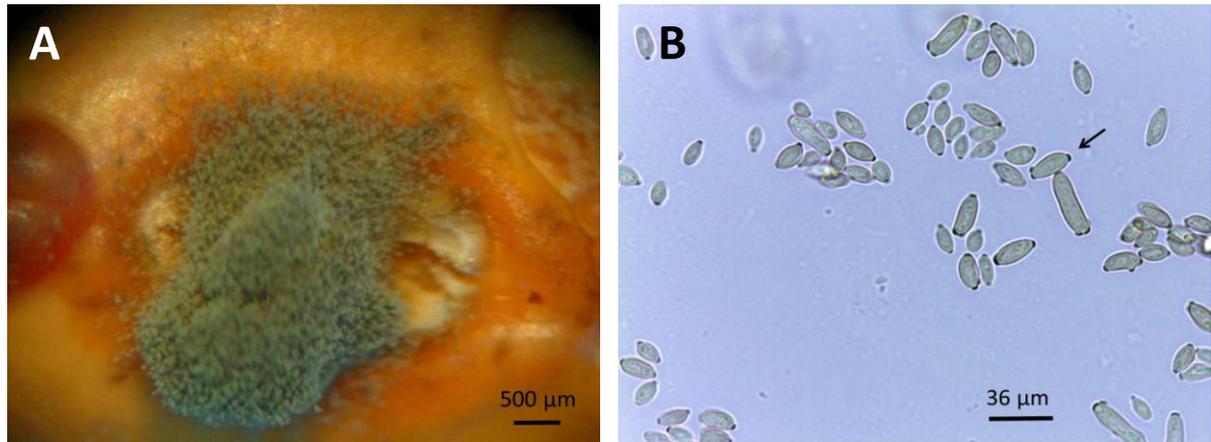
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sementes de feijão cv. 'Pérola' foram provenientes de plantios localizados em áreas experimentais da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Unidade Universitária de Ipameri (Latitude 17°43'S, Longitude 48°08'N, a 790 m de altitude) e armazenadas em sacos de papel, onde permaneceram por 30 dias à temperatura ambiente ( $26^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) no laboratório de sementes da UEG, antes do teste para detecção de *Cladosporium* sp. A análise sanitária das sementes acima especificadas foi realizada pelo método *blotter test* (RAS, 2009). Para tanto, utilizou-se caixas acrílicas transparentes (gerbox – 11 x 11 cm) desinfestadas com hipoclorito de sódio (1%), contendo duas folhas de papel de germinação previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada (ADE) em quantidade igual a 2,5 vezes a massa do papel. As sementes de feijão, naturalmente infestadas por *Cladosporium* sp. foram dispostas em cada caixa gerbox (25 sementes gerbox<sup>-1</sup>) e mantidas a 25°C durante nove dias, com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada examinando-se individualmente todas as sementes em microscópio estereoscópio Zeiss Stemi DV4. Foram empregados 8 gerbox de 25 sementes para a cultivar analisada (cv. 'Pérola'), totalizando 200 sementes. Para confirmação do gênero fúngico presente nas sementes e caracterização micromorfológica, foram confeccionadas lâminas semi-permanentes para observações microscópicas, contendo o material biológico removido diretamente das sementes infectadas, e utilizando ácido láctico como meio de montagem para as lâminas. Em seguida realizou-se o registro de imagens e a caracterização morfológica dos conídios e suas estruturas, pela obtenção de 50 medidas de cada componente, no microscópio de luz Leica DM500, com auxílio do programa LAS EZ 2.0 (100x). Os dados relativos às medidas das estruturas fúngicas de *C. herbarum* nas sementes foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). As preparações microscópicas foram depositadas no Laminário fitopatológico da UEG.

## 3 RESULTADOS

Neste trabalho, as observações foram direcionadas para a presença do fungo *Cladosporium* sp. em sementes de feijão comum cv. 'Pérola', as quais apresentavam manchas ou crescimentos esverdeados na superfície das sementes, principalmente na zona correspondente ao embrião, mais precisamente o hilo da semente (Figura 1A). Este micélio em abundância permitiu que boas preparações microscópicas pudessem ser feitas, sem necessidade de isolamento do fungo. As características distintivas para o gênero e que mais auxiliaram na identificação foram: a cicatriz proeminente nos conídios, conidióforos sem

nódulos, conídios sem septos ou com apenas um septo e, principalmente, o formato do conídio elipsoidal ou limoniforme (Figura 1B).



**Figura 1.** Fungo *Cladosporium herbarum* provenientes de sementes de feijão cv. ‘Pérola’. (A) Hilo da semente de feijão comum colonizado por *C. herbarum*. (B) Seta mostra denticulo (cicatriz) característico do gênero *Cladosporium* nos conídios de coloração marrom-olivécea de formato elipsoidal, uninucleados ou binucleados. Barras correspondem a 500 e 36 µm para as figuras 1A e 1B, respectivamente.

Após mensuração dos conídios de *Cladosporium* obtidos das sementes, verificou-se que estes possuíam dimensões (comprimento x largura) de 7,2 – 10,4 x 3,6 – 4,2 µm e (comprimento médio x largura média) de 8,1 x 4,0 µm (Tabela 1). Assim, de acordo com as características descritas acima, a espécie foi identificada como *Cladosporium herbarum* (Ellis, 1971), a qual ocorreu nas sementes com incidência de 59,5%.

**Tabela 1.** Características micromorfológicas de diferentes espécies de *Cladosporium* publicados por diferentes autores.

Espécie de <i>Cladosporium</i>	Hospedeiro	Tamanho do conídio (µm)	
		Comprimento	Largura
<i>C. cladosporioides</i> <sup>(1)</sup>	<i>Coffee</i> sp., <i>Citrus</i> sp., <i>Vitis</i> sp. <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	3,0 – 7,0	2,0 – 4,0
<i>C. sphaerospermum</i> <sup>(1)</sup>	<i>Anacardium</i> <i>occidentale</i> , <i>Zea</i> <i>mays</i> , <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	3,0 – 5,0	3,0 – 4,5
<i>C. oxysporum</i> <sup>(2)</sup>	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	4,0 – 10,0	2,5 – 4,0
<i>C. herbarum</i> <sup>(1)</sup>	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> , <i>Zea</i> <i>mays</i> , <i>Glycine</i> <i>max.</i>	8,0 – 15,0	3,0 – 6,0
<i>C. herbarum</i> <sup>(3)</sup>	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	7,2 – 10,4	3,6 – 4,2

<sup>(1)</sup>Ellis (1971); <sup>(2)</sup> Huang et al. (2012); <sup>(3)</sup> Espécie encontrada nas sementes de feijão cv. ‘Pérola’.

#### 4 DISCUSSÃO

As sementes de feijão cv. ‘Pérola’ obtidas de áreas experimentais da UEG UnU de Ipameri, Goiás, apresentaram 59,5% de incidência de *C. herbarum*. Similarmente, Carvalho et al. (2011) verificaram 97% de incidência de *Cladosporium* sp. em sementes de feijoeiro cv. ‘Jalo Precoce’, procedentes de campos de produção da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil. Assim, para o fungo *Cladosporium*, que são considerados cosmopolitas em sua distribuição e comumente encontrados em plantas e suas sementes (Bensch et al., 2012, Venugopalan e Giridhar, 2012), altos níveis de incidência (em torno de 50 até 97%) parecem ser comuns em lotes de sementes provenientes do campo, os quais podem variar conforme o tipo de cultivar avaliada. As características referentes aos sinais observados nas sementes, representadas por conidióforos altos, escuros, eretos, ramificados irregularmente no ápice, agrupados em colônias de coloração cinza a oliva, concentrada sobre o hilo das sementes (Figura 1A), adicionadas às características micromorfológicas verificadas no presente trabalho (Tabela 1 e Figura 1A), indicaram que a espécie ocorrente nas sementes era *C. herbarum* (Ellis, 1971; RAS 2009; Huang et al., 2012). Além disso, para as comparações, foram utilizadas as características morfológicas de outras espécies de *Cladosporium* ocorrentes em sementes de feijão.

Os resultados das dimensões dos conídios de *Cladosporium* deste trabalho estão próximos aos que Ellis (1971) descreveu para *C. herbarum*, os quais especificam conídios com dimensões de 8,0 – 15,0 x 3,0 – 6,0  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Adicionalmente, em conformidade com Ellis (1971), foi possível a observação de conidióforos retos, de coloração cinza claro a marrom-oliváceos, lisos, com cerca de 250,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 3,0 – 6,0  $\mu\text{m}$  de largura (Figura 1B). Os conídios de formato elipsoidal a limoniforme, arredondado em uma das extremidades, de coloração clara a marrom-olivácea, uni ou binucleados e com superfície apresentando pequenas verrugas ou cicatriz bem distintas também foram visíveis (Figura 1A). Outras espécies com ocorrência provável em sementes de feijão, tais como *C. oxysporum*, *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, embora possuam similaridades em relação a forma e coloração dos conídios, podem ser refutadas, visto que o comprimento mínimo dos conídios é bem menor no caso destas espécies. Segundo Huang et al. (2012), o fungo *Cladosporium oxysporum* possui conídios cujo formato varia entre subglobosos ou ovoídes a subcilíndrico. Seus conidióforos medem de 40,0 – 670,0 x 3,0 - 5,5  $\mu\text{m}$  e os conídios medem de 4,0 a 10,0 x 2,5 a 4,0  $\mu\text{m}$ . Tais medidas sugerem que os conídios de *C. oxysporum* apresentam comprimento e largura em uma faixa abaixo (menor) quando comparado com *C. herbarum* (Tabela 1). Em grãos, tais como o cafeeiro, é comum a ocorrência de *Cladosporium cladosporioides*, onde o conidióforo foi verificado com medidas de 100,0 – 245,0 x 2,0 – 5,0  $\mu\text{m}$  e, diferentemente de *C. herbarum*, é pouco pigmentado, liso ou pouco rugoso (Ellis, 1971). Os conídios embora possuam formato elipsoidal a limoniforme e pigmentação verde-oliva clara, são bem menores que *C. herbarum*, principalmente quanto ao seu comprimento, pois medem de 3,0 – 7,0 x 2,0 – 4,0  $\mu\text{m}$  (Ellis, 1971). *Cladosporium sphaerospermum* também é uma espécie bastante comum em sementes e morfologicamente semelhante a *C. herbarum*. Entretanto, a característica distintiva entre as duas espécies reside no formato do conídio, onde *C. herbarum* possui conídios de formato elipsoidal ou limoniforme (com comprimento que vai de 7,2 a 15,0  $\mu\text{m}$ ), enquanto que *C. sphaerospermum* possui conídios com formato globoso ou subgloboso (com comprimento que vai de 3,0 a 5,0  $\mu\text{m}$ ) (Ellis, 1971).

Durante a análise estatística das dimensões dos conídios de *C. herbarum*, atenção foi dada a variabilidade das medidas obtidas. Assim, verificou-se que o coeficiente de variação para o comprimento e largura dos conídios foi de 9,23 e 3,72%, respectivamente, similarmente a *A. alternata* f. sp. *citri*, cuja variabilidade dos dados referentes as medidas de todas as estruturas do fungo não passou de 5,1% (Carvalho et al., 2008). Assim, este parece ser um padrão de variação (menor que 10%) nas medidas obtidas para fungos Hyphomycetes.

Segundo Marino et al. (2009), independentemente das variedades de feijão, existe uma maior incidência de fungos nas sementes que não foram desinfestadas superficialmente, sugerindo que os fungos podem se encontrar no interior da semente e/ou associados às rachaduras (danos mecânicos) e com grande possibilidade de serem transmitidos mesmo após tratamento superficial. Em condições de produção, a utilização de sementes contaminadas por patógenos, associados externa ou internamente, podem causar morte de sementes após o plantio, devido à rapidez de desenvolvimento e alta agressividade de determinados grupos de patógenos na semente (Zorato et al., 2001) e que retornam a atividade assim que encontram condições favoráveis (solo, clima), deteriorando a semente, antes que esta evidencie os primeiros indícios de germinação, pela ação de enzimas e toxinas (Menten et al., 2013). É importante frisar que o patógeno se mantém viável na semente durante o seu armazenamento e sendo também de difícil detecção, podendo ser introduzido em novas áreas (Carvalho et al., 2011). Finalmente, destaca-se o desenvolvimento deste estudo, pois poucos são os trabalhos abordando o fungo *Cladosporium* em sementes de feijão, mesmo que seja bastante comum a sua ocorrência.

## 5 CONCLUSÕES

A cultivar de feijão ‘Pérola’ proporciona alta incidência de *C. herbarum* nas sementes, em torno de 59,5%. Baseando-se nas características culturais e micromorfológicas dos conídios encontrados, comprimento x largura de 7,2 – 10,4 x 3,6 – 4,2  $\mu\text{m}$  (8,1 x 4,0  $\mu\text{m}$ ), verificou-se o fungo tratar-se de *C. herbarum* em sementes de feijão cv. ‘Pérola’.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo suporte financeiro (Processo 201310267001026). À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelos isolados de *Trichoderma harzianum* (TRTM 02/2012).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALWATHNANI, H. A.; PERVEEN, K.; TAHMAZ, R.; et al. Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under *in vitro* and pot conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.312-319, 2012.
- BARBOSA, F. R. e GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Documentos, 247p.
- BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z.; et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v.72, p.1-401, 2012.
- CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; et al. M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.822-828, 2011.
- CARVALHO, D. D. C.; ALVES, E.; BATISTA, T. R. S.; et al. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.792-798, 2008.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t/>>. Acesso em 30 de maio de 2014.
- ELLIS, M. B. 1971. **Dematiaceous hyphomycetes**. Wallingford: CAB International, 608p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.
- GARCIA, L. P.; JUSTINO, A.; RAMOS, H. H.. Análise da pulverização de um fungicida na cultura do feijão, em função o tipo de ponta e do volume aplicado. **Bragantia**, v.61, p.291-295, 2002.
- HUANG, X. Y.; LIU, Z. H.; HU, J. X.; et al. First report of a leaf spot on pepper caused by *Cladosporium oxysporum* in China. **Plant Disease**, v.96, p.1072, 2012.
- KINTSCHEV, M. R. 2013. **Compatibilidade entre a inoculação de *Rhizobium tropici* e a aplicação de fungicidas, cobalto e molibdênio em sementes de feijoeiro, MS**. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Mato Grosso do Sul, Aquidauana, 62p.
- MARINO, R. H.; MESQUITA, J. B.; ANDRADE, K. V. S.; et al. Incidência de fungos em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. provenientes do Estado de Sergipe. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, p.26-30, 2009.
- MELO, C. L. P.; CARNEIRO, J. E. S.; CARNEIRO, P. C. S.; et al. Linhagens de feijão do cruzamento 'Ouro Negro' x 'Pérola' com características agronômicas favoráveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1593-1598, 2006.
- MENTEN, J. O. M.; MORAES, M. H. D.; NOVEMBRE, A. D. L. C.; ITO, M. A. 2006. Qualidade das sementes de feijão no Brasil. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_2/SementesFeijao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/SementesFeijao/index.htm)> Acesso em 05 de agosto de 2014.

PEREIRA, H. S.; SANTOS, J. B.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnoses selecionadas quanto a características agronômicas desejáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.209-215, 2004.

REGRAS PARA ANÁLISE DE SEMENTES. 2009. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ASC, 399 p.

VENUGOPALAN, A.; GIRIDHAR, P. Mycoflora associated with seeds of *Bixa orellana* L. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.2091-2094, 2012.

VIDA, J. B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANN, D. J.; et al. 2004. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.355-372, 2004.

ZIMMERMANN, M. J. O.; TEIXEIRA, M. G. Origem e evolução. In: ZIMMERMANN, M. J. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. 1988. **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. p.79-85.

ZORATO, M. F.; HOMECHIN, M.; HENNING, A. A. Efeitos da assepsia superficial com diferentes agentes químicos na incidência de microrganismos em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, p.159-166, 2001.

## Capítulo II

**Caracterização fisiológica de *Trichoderma harzianum* e ação de seus metabólitos voláteis e não voláteis sobre *Cladosporium herbarum***

## RESUMO

Fungos do gênero *Trichoderma* constituem alternativa viável para o controle biológico de patógenos de sementes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade hiperparasítica e o efeito de metabólitos voláteis e não voláteis de cinco isolados de *T. harzianum* no controle de *Cladosporium herbarum*, bem como avaliar o crescimento do agente de biocontrole em diferentes temperaturas. O hiperparasitismo foi verificado em microscópio de luz a partir da visualização das estruturas dos fungos em amostras retiradas da zona de confronto dos mesmos, quando em culturas pareadas (CP). Além disso, os antagonistas tiveram seus metabólitos avaliados quanto à inibição do crescimento de *C. herbarum* em ensaios de metabólitos voláteis (MV) e não voláteis termoestáveis (MNVT). O crescimento micelial dos antagonistas foi avaliado ao longo de sete dias, nas temperaturas de 10°C, 25°C, 30°C e 40°C, sob fotoperíodo de 12 h, mediante medições do diâmetro das colônias. O isolado CEN287 de *T. harzianum* demonstrou atividade hiperparasítica, pelo enrolamento de suas hifas sobre as hifas de *C. herbarum*. Quanto à produção de mv tóxicos ao patógeno, o isolado CEN288 inibiu em 59% o crescimento de *C. herbarum*, enquanto que para MNVT, todos os isolados foram similares entre si, inibindo entre 29 e 40% o crescimento do patógeno. Não houve diferença entre a taxa de crescimento dos isolados, quando estes foram submetidos a uma mesma temperatura. Além disso, verificou-se que o ótimo de crescimento para *T. harzianum* ocorre a 25 °C.

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

## ABSTRACT

The genus *Trichoderma* comprises fungi whose use can be a viable alternative for the biological control of seed borne pathogens. Thus, the objective of this study was to evaluate the hiperparasitism and the effect of volatile and non-volatile metabolites from five isolates of *Trichoderma harzianum* on the control of *Cladosporium herbarum*, as well to evaluate their growth at different temperatures. The hiperparasitism was verified by visualization of the structures of both pathogen and biocontrol agent in samples taken from the confrontation zone in paired (pc) through a scanning electron microscope. Besides, the antagonists had its metabolites evaluated on the growth of *C. herbarum* in assays using volatile (vm) and non-volatile thermostable metabolites (nvtm). The mycelial growth of the antagonists was assessed over 7 days, at temperatures of 10°C, 25°C, 30°C and 40°C, under 12 h photoperiod, through colony diameters measuring. The isolated CEN287 allowed the hiperparasitism, by rolled-up the *C. herbarium* hyphae, from pc assay samples. For the production of vm toxic to the pathogen, CEN288 inhibited 59% of the *C. herbarum* growth, while for nvtm, all isolates were similar, inhibiting among 29 and 40% the pathogen growth. No differences were not verified among the isolates growth rate, when these were submitted to the same temperature. Besides, it was found that the optimum for the *T. harzianum* growth was 25°C.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, biological control, seeds pathology

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado a mais importante leguminosa usada na alimentação humana, pois compreende 50% das leguminosas consumidas em forma de grãos em todo o mundo. Além disso, constitui importante fonte de proteína para as populações de baixa renda na América Latina e na África (Alwathnani et al., 2012). O Brasil se destaca no cenário global como produtor e consumidor dessa leguminosa, que é amplamente cultivada mundialmente.

A maioria das culturas destinadas à produção de alimentos está sujeita ao ataque de doenças, cujos agentes etiológicos em grande parte são transmitidos pelas sementes (Corrêa et al., 2008). No caso específico do feijoeiro, mais de 50% das enfermidades são transmitidas via sementes (Marino e Mesquita; 2009). A incidência de patógenos em sementes de feijoeiro, tais como o fungo *Cladosporium herbarum*, provoca podridões e irregularidades na germinação, bem como, no estabelecimento do estande inicial da cultura (Carvalho et al., 2011a).

Carvalho et al (2011b) preconizam o tratamento de sementes com agentes biológicos em substituição aos químicos, com vantagens, especialmente do ponto de vista sócio-ambiental. Os fungos do gênero *Trichoderma* revestem-se de interesse para pesquisa em controle biológico por serem, em grande parte, exímios produtores de antibióticos e enzimas degradadoras de parede celular de outros fungos e pela facilidade com que colonizam os diversos substratos, inclusive raízes de plantas (Machado et al., 2012). Seus vários mecanismos, atuando individualmente ou em conjunto, podem induzir efeitos supressivos sobre as doenças vegetais (Harman et al., 2004). Por exemplo, o hiperparasitismo pode ocorrer simultaneamente à produção de metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento e/ou a germinação de esporos do fitopatógeno alvo (antibiose). Tais substâncias, de baixo peso molecular e com atividade antimicrobiana, podem ser voláteis ou não voláteis (Carvalho et al., 2011b). Dentre essas, citam-se: alquilpironas, isonitrilas, policetídeos, peptabólitos, dicetopiperazinas, sesquiterpenos e esteróides. O modo de ação desses metabólitos com atividade antibiótica é na maioria das vezes desconhecido, haja vista a escassez de informações relativas ao papel dessas substâncias, obtidas a partir de bioensaios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo gliovirina, gliotoxina e peptabólitos como as tricorzianinas os mais estudados (El-Hasan et al., 2009).

A temperatura é um fator essencial para manipular o crescimento, a esporulação e a produção de metabólitos voláteis e não-voláteis, além de fatores envolvidos na produção de enzimas degradadoras de parede celular e na competição (Woo et al., 2006). Portanto, é importante estudar o efeito da temperatura sobre o crescimento de fungos antagonistas, de

modo a determinar a temperatura mais apropriada para seu crescimento (Alwathnani et al., 2012). Assim, o objetivo deste trabalho foi conhecer a capacidade hiperparasítica, o efeito de metabólitos voláteis e não voláteis de cinco isolados de *T. harzianum* sobre o patógeno de sementes *C. herbarum* e, avaliar o crescimento do antagonista sob diferentes temperaturas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção, caracterização e identificação dos isolados dos antagonistas e do fitopatógeno**

Os isolados de *T. harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) pertencem à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa e encontram-se identificados com base em caracteres morfológicos, de acordo com a chave interativa descrita por Samuels et al. (2014) e moleculares, pelo sequenciamento das regiões ITS-1 e ITS-2 do rDNA. O isolado de *C. herbarum* (UEG0812), obtido de amostras de sementes de feijoeiro infectadas pelo patógeno foi identificado conforme Ellis (1971).

### **2.2 Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Cladosporium herbarum***

Utilizou-se o método de culturas pareadas (CP), como descrito a seguir. Discos de ágar (5 mm Ø) contendo micélio do antagonista (cada isolado individualmente) e do patógeno, com seis dias de cultivo, foram transferidos para placa de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), sendo estes posicionados em lados opostos na placa. Estas foram mantidas em câmara de incubação do tipo B.O.D. a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período, realizaram-se as avaliações, que consistiram na atribuição de notas, em conformidade com a escala de Wells; Markhan e Bell; Wells; Markhan (1982). Além disso, cada nota da escala foi transformada em percentual de colonização da placa de Petri pelo antagonista. Este ensaio foi conduzido duas vezes com quatro repetições para cada isolado de *T. harzianum*.

### **2.3 Estudo da interação patógeno x antagonista por microscopia de luz.**

Para verificar o hiperparasitismo, discos de ágar (1 cm<sup>2</sup> de área) provenientes da zona de confronto entre os dois fungos (patógeno e antagonista), aos 10 dias de cultivo pareado, foram removidos (4 discos tratamento<sup>-1</sup>) para montagem de lâminas não-permanentes. As imagens de microscopia de luz foram capturadas no microscópio ótico Leica DM500, utilizando o *software* LAZ EZ.

#### **2.4 Ação de metabólitos voláteis (MV) e não voláteis termoestáveis (MNVT) de *Trichoderma harzianum* sobre *Cladosporium herbarum***

Para o teste com MV, bases das placas contendo o antagonista e o patógeno foram sobrepostas e unidas com filme plástico transparente. As placas foram incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12 h, de forma que as bases superiores fossem aquelas que continham o patógeno. Após sete dias, quando a colônia testemunha (patógeno sem antagonista) encontrava-se totalmente colonizada, tomaram-se as medidas de diâmetro das colônias de *C. herbarum*, obtendo-se os valores médios de duas medidas diametralmente opostas. Para obtenção das médias do crescimento considerou-se, como 100% de crescimento, a área final ocupada pela testemunha.

Para o teste com MNVT, cinco discos (5 mm Ø) de ágar - micélio retirados das margens de culturas de *T. harzianum* foram transferidos para frascos Erlenmeyer (500 mL), contendo 250 mL de meio de batata-dextrose (BD). Após seis dias de cultivo sob agitação (Incubadora Kline modelo: Q225K) a 120 rpm e temperatura de 25°C, as culturas foram filtradas em gaze esterilizada e posteriormente autoclavadas a 120°C durante 20 min. Em seguida, cinco mililitros do filtrado de cada isolado foi acrescentado a 15 mL de BDA fundente (ágar a 28%), nas placas de Petri. Após solidificação do meio, um disco de ágar (5 mm Ø), contendo micélio do patógeno, foi depositado sobre a superfície do meio. A testemunha consistiu na adição de 5mL de água destilada esterilizada (ADE) ao BDA fundente, em vez do filtrado de cultura de *Trichoderma*. As placas foram incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12h, até completa colonização do meio pelo patógeno nas placas testemunhas. Tomaram-se, então, as medidas de diâmetros das colônias do patógeno, ao sétimo dia. Os experimentos com MV e MNVT foram conduzidos duas vezes, em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com quatro repetições para cada isolado de *T. harzianum*.

#### **2.5 Crescimento de *Trichoderma harzianum* a diferentes temperaturas**

Para este teste, discos de ágar (5 mm Ø) contendo micélio dos antagonistas foram, individualmente, depositados no centro de placas de Petri contendo meio BDA. Após o desenvolvimento das colônias, o crescimento radial do micélio foi estimado pela média de duas medidas tomadas diametralmente opostas, aos sete dias de incubação nas temperaturas de 10, 25, 30, 40°C. Os dados do crescimento dos fungos em cada temperatura foram transformados em porcentagem (Alwathnani et al., 2012). Este ensaio foi conduzido duas vezes com quatro repetições para cada isolado de *T. harzianum*.

## 2.6 Análises estatísticas

Os dados referentes aos experimentos de CP, MV e MNVT, foram submetidos à análise de variância ao teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Realizaram-se, também, análises de regressão para o percentual de colonização das placas submetidas a diferentes temperaturas. Em todas as análises foi empregado o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

## 3 RESULTADOS

Os valores médios de colonização (%) das placas de Petri por *T. harzianum* em cultivo pareado com *C. herbarum*, verificado aos sete dias de cultivo, foram maiores com os isolados CEN287 e CEN316, cujo crescimento médio atingiu 93,75 e 100,0% da superfície do meio BDA, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Crescimento de *Trichoderma harzianum* em cultivo pareado com *Cladosporium herbarum* e classificação dos isolados quanto ao antagonismo, segundo escala de Bell et al. (1982), após sete dias de cultivo.

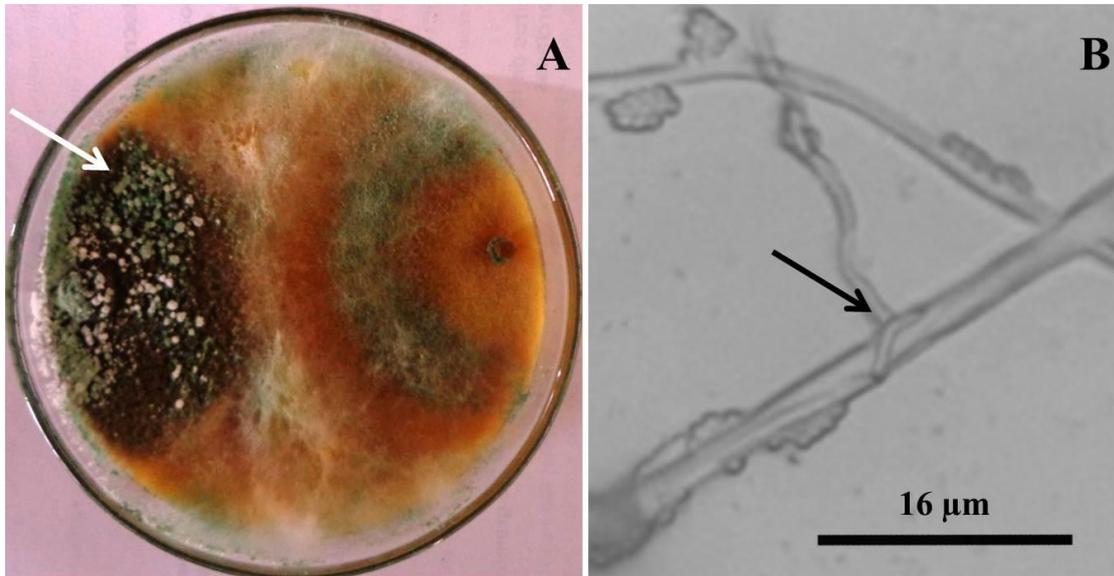
Isolados de <i>T. harzianum</i>	Colonização (%) das placas de Petri por <i>T. harzianum</i> em cp com <i>C. herbarum</i> <sup>(1)</sup>	Classificação dos isolados de <i>T. harzianum</i> segundo escala de BELL et al. (1982) <sup>(2)</sup>
CEN287	93,75 a	1
CEN288	90,62 b	2
CEN289	87,50 b	2
CEN290	87,50 b	2
CEN316	100,00 a	1
Coeficiente de variação	4,97%	-

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ );

<sup>(2)</sup>Classe 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Classe 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

Esses valores foram estatisticamente superiores aos demais. Após o contato entre as colônias do patógeno e do antagonista (especialmente o isolado CEN287), estes continuaram em crescimento, invadindo totalmente a colônia do patógeno, sobre as quais produziram conídios (Figura 1A). Os valores médios das notas dos isolados, segundo a escala de Bell et al. (1982), ficaram entre 1 e 2, sendo que as notas para CEN287 e CEN316 tiveram o valor 1. Após os testes em CP, foram retiradas amostras da zona de confronto do patógeno com *T.*

*harzianum* (isolado CEN287), as quais permitiram visualizar as interações hiperparasíticas entre ambos, conforme ilustra a Figura 1.



**Figura 1.** Interações parasíticas entre *Trichoderma harzianum* (CEN287) e *Cladosporium herbarum* obtidos de pareamento de culturas (CP – 10 dias) e observados em microscopia de luz. (A) Isolado CEN287 em CP com o patógeno *C. herbarum*. Seta indica o isolado CEN287 colonizando e esporulando sobre o patógeno; (B) Seta indicando o enrolamento de hifa de *T. harzianum* (CEN287) em uma hifa de *C. herbarum*.

Quanto à produção de MV, o isolado CEN288 foi o que exibiu melhor ação antifúngica, pois inibiu em 59% o crescimento do patógeno, sendo estatisticamente inferior aos demais (Tabela 2). Os outros isolados foram inferiores à testemunha, apresentando valores médios de porcentagem de inibição que variaram entre 6,65 e 32,72%. Já no experimento para verificação do efeito de MNVT, todos os isolados foram similares entre si, sendo inferiores à testemunha. O percentual médio de inibição por MNVT variou entre 28,67 e 40,14% (Tabela 2). Não houve diferença estatística na média geral de crescimento do patógeno em presença de MV e MNVT.

**Tabela 2.** Efeito inibidor de metabólitos voláteis (MV) e não voláteis termoestáveis (MNVT) de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*.

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Crescimento (%) de colônias de <i>C. herbarum</i> sob o efeito de metabólitos de <i>T. harzianum</i> <sup>(1, 2)</sup>	
	MV	MNVT
CEN287	67,28 bA	66,41 aA
CEN288	41,48 aA	62,97 aB
CEN289	93,35 cB	69,39 aA
CEN290	77,15 cA	71,33 aA
CEN316	88,03 cB	59,86 aA
Testemunha <sup>(3)</sup>	100 c	100 b
Média <sup>(4)</sup>	73,45 A	65,99 A
CV(%)	20,43%	10,47%

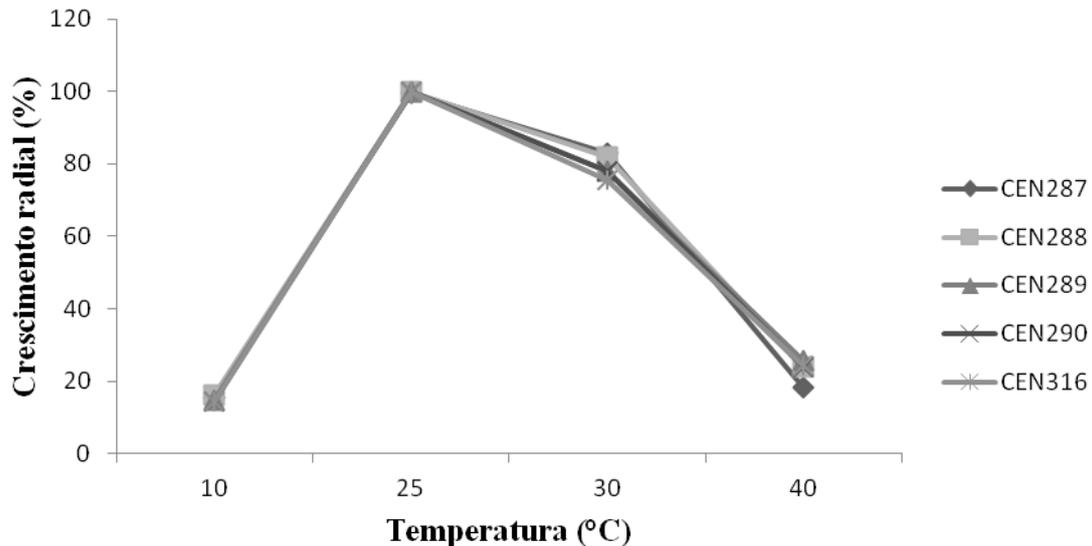
<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ );

<sup>(2)</sup>Valores relativos a Testemunha, obtidos de colônias com 7 dias de crescimento;

<sup>(3)</sup>Metabólitos voláteis: sem adição de disco do antagonista na placa correspondente; Metabólitos não voláteis: adicionou-se 5 mL de ADE ao BDA fundente das placas;

<sup>(4)</sup>Média geral do crescimento de colônias de *C. herbarum* sob o efeito de metabólitos de *T. harzianum*(%).

Não houve diferença entre a taxa de crescimento dos isolados, quando estes foram submetidos a uma mesma temperatura (Figura 2). Um modelo polinomial de segundo grau significativo e com alto coeficiente de determinação foi obtido para cada isolado, separadamente, como a seguir: (CEN287:  $y = -0,3513x^2 + 17,6130x - 124,9368$ ;  $R^2 = 0,9937$ ;  $p < 0,01$ ), (CEN288:  $y = -0,3345x^2 + 16,9139x - 118,7834$   $R^2 = 0,9889$ ;  $p < 0,01$ ), (CEN289:  $y = -0,3245x^2 + 16,4902x - 116,4911$ ;  $R^2 = 0,9756$ ;  $p < 0,01$ ), (CEN290:  $y = -0,3304x^2 + 16,7550x - 119,3543$ ;  $R^2 = 0,9781$ ;  $p < 0,01$ ) e (CEN316:  $y = -0,3245x^2 + 16,4502x - 116,6055$ ;  $R^2 = 0,9691$ ;  $p < 0,01$ ). Assim, em se tratando do percentual médio de colonização das placas de Petri, esses modelos representaram o crescimento micelial dos isolados da seguinte forma: 10°C (14,29 a 16,28% de colonização); 25°C (99,71 a 100%); 30°C (75,71 a 82,85%) e 40°C (18,42 a 25,57%).



**Figura 2.** Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial de *Trichoderma harzianum*. Cada valor médio provém de experimento com cinco repetições.

#### 4 DISCUSSÃO

Os agentes de controle biológico podem agir contra patógenos, usando um ou mais dos seguintes mecanismos: competição, antibiose e parasitismo (Demirci et al., 2011). Desse modo, a redução do crescimento de *Cladosporium herbarum* no teste CP pode ser atribuída à competição por espaço e por nutrientes presentes no meio de cultura e/ou ao hiperparasitismo, verificado na Figura 1, conforme encontrado, também, por Louzada et al. (2009). Os principais mecanismos de biocontrole utilizados por *Trichoderma* quando confrontados com fungos fitopatogênicos, são o hiperparasitismo e a antibiose (Mohamed e Haggag, 2006; Carvalho et al., 2011b), ambos confirmados no presente trabalho. A zona de inibição observada com o isolado CEN287 sugere ação fungistática dos metabólitos segregados por este isolado, como sugerido por Kexiang et al. (2005). O fungo *T. harzianum* tem demonstrado diferentes graus de sucesso contra patógenos em ensaios *in vitro*, utilizando-se o método de pareamento de culturas, como recentemente foi verificado por Carvalho et al. (2011b) e Auler et al. (2013). Em decorrência disso, produtos comerciais têm sido lançados para o controle, principalmente de patógenos habitantes do solo (Geraldine et al., 2013). Entretanto, não existem, ainda no mercado, produtos a base de *Trichoderma* para o controle de *C. herbarum* em sementes em que pese o fato de já ter sido verificado antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Cladosporium* sp. (Carvalho et al., 2011a).

O avanço do crescimento e sobreposição de *T. harzianum* (CEN287) sobre colônias de *C. herbarum*, assim como o enrolamento nas hifas deste constatado neste trabalho está em conformidade com Harman et al. (2004), que consideram complexos os eventos que levam ao hiperparasitismo. De acordo com estes autores, os eventos verificados nas amostras aqui

analisadas, podem ser interpretados da seguinte forma: (1) *T. harzianum* (CEN287) detectou o crescimento de *C. herbarum* em sua direção; (2) CEN287 se enrola sobre o patógeno, formando ou não apressórios na superfície da hifa do fungo alvo; (3) O enrolamento teria sido mediado pela ligação entre carboidratos presentes na parede celular do *Trichoderma* à lectinas do fungo alvo; (4) Por último, uma vez estabelecido o contato, seria viável constatar a presença de enzimas degradadoras da parede celular do fungo alvo. Diante do exposto, não seria razoável afirmar que o hiperparasitismo aqui verificado teria sido resultante de antibiose, pois o antagonista pode, por meio de apressórios, penetrar mecanicamente o lúmen da hifa do fungo alvo (Louzada et al., 2009), colonizá-la e emitir estruturas reprodutivas a partir destas. De outra forma, a penetração também pode ser mediada pela produção de enzimas degradadoras de parede celular. Estas, por sua vez, podem causar efeitos antimicrobianos, sem rompimento da parede celular do patógeno seguida da penetração. Por outro lado, a competição por nutrientes, especialmente carbono, sugerida pelos testes de CP, traduz-se em fenômeno fungistático (De Boer et al., 2003). Finalmente, vale mencionar que esta é a primeira evidência de hiperparasitismo de *T. harzianum* sobre *C. herbarum*.

Neste trabalho, apenas o isolado CEN288 se destacou quanto a produção de MV, com valores médios de inibição superiores a 50%, semelhantemente aos encontrados de Lopes et al. (2012). Em conformidade com Carvalho et al. (2011a), a alta produção de antibióticos não voláteis não foi correlacionada à alta produção de inibidores voláteis. Esses metabólitos produzidos por *T. harzianum* desempenham papel importante na supressão do crescimento micelial do patógeno, dado que ambos os fungos compartilhariam a mesma câmara de crescimento. Sendo assim, tal evento puramente fungistático, seria determinante no controle da doença disseminada por sementes (Agüero et al., 2008) e também no caso daquelas causadas por patógenos habitantes do solo (De Boer et al., 2003). Uma possível explicação para CEN288 ter se destacado dos demais quanto a produção de MV reside no fato de que os mecanismos de ação, tais como produção de MV tóxicos, podem variar entre isolados da mesma espécie (Carvalho et al., 2011b).

Conforme postula Demirci et al. (2011), muitos fatores devem ser analisados para escolha de um isolado visando sua aplicação a campo. Nesse aspecto, os testes de produção de MNVT permitem inferir sobre a termoestabilidade de tais metabólitos frente a altas temperaturas do solo em regiões tropicais. De acordo com Jayaprakashvel et al. (2010), a autoclavagem (121°C por 15 minutos) de metabólito proveniente de um agente de biocontrole pode reduzir em 24% a sua atividade antifúngica quando comparada a não autoclavagem. Já Carvalho et al. (2007) postulam que moléculas bioativas, presentes em metabólitos de origem microbiana, podem se decompor em outras moléculas menos ativas ou mesmo inativas,

quando submetidas a condições inadequadas que levem à degradação das moléculas. Considerando os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a inibição média de 35% do crescimento micelial de *C. herbarum* obtida com metabólitos previamente submetidos a autoclavagem, por exemplo, chegaria a 45%, quando sem autoclavagem. O fato de alguns desses metabólitos se mostrarem estáveis em várias temperaturas suportaria a idéia de que os mesmos possam se manter ativos frente a diferentes fatores, como insolação e temperaturas mais elevadas dos solos de diferentes regiões, conforme mencionado anteriormente. Importante salientar que trabalhos desta natureza vislumbram a perspectiva de síntese destes metabólitos secundários seletivos para determinados organismos, por serem vantajosos em relação a outras moléculas de natureza química, sob a ótica ambiental (Jayaprakashvel et al., 2010).

Finalmente, a atenção foi dirigida à temperatura como fator essencial para a capacidade de manipular o crescimento de um microrganismo, a sua esporulação, bem como a produção de metabólitos de interesse, aliada à busca do conhecimento dos mecanismos de controle biológico (Woo et al., 2006). A partir de estudos desta natureza, pode-se conseguir otimizar a produção do agente de biocontrole. Como exemplo de estudo desta natureza, citam-se os estudos desenvolvidos por Alwathnani et al. (2012), ao obterem incremento no crescimento micelial de *Penicillium citrinum*, *T. viride* e *T. harzianum* de 100%, apenas manipulando a temperatura, a qual foi mantida a 25°C. Tais resultados corroboram com os dados obtidos com os isolados de *T. harzianum* aqui estudados. Também Hajieghrari et al. (2008) considera que a temperatura ótima para crescimento micelial não difere entre isolados da mesma espécie de *Trichoderma*, embora a maioria destes sejam considerados mesófilos. De forma análoga, Auler et al. (2013) verificaram que o antagonismo de *T. harzinaum* contra *S. rolfssi* diminuiu com o aumento da temperatura de 22°C para 28°C em testes de cultura pareada, condição esta em que a capacidade de crescimento micelial do antagonista para a rápida colonização do meio é fundamental.

## 5 CONCLUSÕES

O isolado CEN287 exerce o hiperparasitismo sobre *C. herbarum*, sendo este o mais evidente mecanismo de controle biológico exercido por este isolado sobre o patógeno. A temperatura de crescimento ótima de *T. harzianum* é de 25°C, independentemente de isolado.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo suporte financeiro (Processo 201310267001026). À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelos isolados de *Trichoderma harzianum* (TRTM 02/2012).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÜERO, L.E.M.; ALVARADO, R.; MARTÍNEZ, A.; et al. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* Rifai. **Interciência**, v.33, p.219-222, 2008.
- ALWATHNANI, H.A.; PERVEEN, K.; TAHMAZ, R.; et al. Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under *in vitro* and pot conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.312-319, 2012.
- 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 Online**, v.7, p.359-365, 2013.
- 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.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M.; et al. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011a.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M.; et al. 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, 2011b.
- CARVALHO, D.D.C.; OLIVEIRA, D.F.; CORRÊA, R.S.B.; et al. Rhizobacteria able to produce phytotoxic metabolites. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.759-765, 2007.
- CORRÊA, B.O.; MOURA, A.B.; DENARDIN, N. D.; et al. Influence of bean seed microbiolization on the transmission of *Colletotrichum Lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p-156-163, 2008.
- DE BOER, W; VERHEGGEN, P; KLEIN GUNNEWIEK, P.J.A; et al. Microbial community composition affects soil fungistasis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.835-844, 2003.
- DEMİRCİ, E.; DANE, E.; EKEN, C. In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. **Turkish Journal of Biology**, v.35 p.457-462, 2011.
- EL-HASAN, A.; WALKER, F.; SCHÖNE, J.; et al. Detection of viridiofungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v.124, p.457-470, 2009.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Wallingford: CAB International, 1971. 608p.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

GERALDINE, A.M.; LOPES, F.A.C.; CARVALHO, D.D.C.; et al. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v.67, p.308-316, 2013.

HAIJIEGHRARI, B.; TORABI-GIGLOU, M.; MOHAMMADI, M.R.; et al. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.967-972, 2008.

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

JAYAPRAKASHVEL, M.; SELVAKUMAR, M.; SRINIVASAN, K.; et al. Control of heath blight disease in rice by thermostable secondary metabolites of *Trichothecium roseum* MML003. **European Journal of Plant Pathology**, v.126, p.229-239, 2010.

KEXIANG, G.; XIAOQUANG, L.; FRIESEM, D.; et al. Cell wall degrading enzymes involved in mycoparasitism of the biocontrol agent *Chaetomium spirale* ND35. **Scientia Sinicae**, v.41, p.205-210, 2005.

LOPES, F.A.C.; STEINDORFF, A.S.; GERALDINE, A.M.; et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v.116, p.815-824, 2012.

LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO et al. 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.

MACHADO, D.D.F.; PARZIANELLO, F.R.; SILVA, A.C.F.; et al. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, p.274-288, 2012.

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

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

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 31 de janeiro de 2014.

WOO, S.L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; et al. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v.96, p.181-185, 2006.

### Capítulo III

***Trichoderma harzianum* reduz a incidência de *Cladosporium herbarum* em feijão  
sementes comum e promove o desenvolvimento das plântulas**

## RESUMO

Foram avaliados o controle de *Cladosporium herbarum* em sementes de feijão e a promoção do desenvolvimento de plântulas por suspensão de conídios (SC) e metabólitos autoclavados (MA) de cinco isolados de *Trichoderma harzianum*. Sementes de feijão cv. Pérola contaminados com *C. herbarum* foram tratados com SC e MA de *T. harzianum*, e, posteriormente, submetidos a testes de germinação e vigor. Número de plântulas normais, comprimento de raiz, hipocótilo e folha, e comprimento total, biomassa total, razão da massa raiz (RMR), do caule (RMC), da folha (RMF), razão da parte aérea/ sistema radicular (PA/SR) e área foliar foram avaliadas. Os isolados CEN289 e CEN290 (CS e AM) controlaram de 66 a 77% de *C. herbarum* nas sementes de feijão e obtiveram maior número de plântulas normais em relação ao controle, bem como a maior biomassa total. Além disso, os isolados CEN289 e CEN290 foram os melhores para o comprimento da raiz e do caule nos experimentos com CS. Nossos resultados demonstraram o potencial de *T. harzianum* no controle de *C. herbarum* em sementes de feijão e aumentou o acúmulo de biomassa e do crescimento vegetativo de plântulas tratadas com os isolados CEN289 e CEN290.

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

## ABSTRACT

The control of *Cladosporium herbarum* on common bean seeds and the promotion of the development of seedlings by conidial suspension (CS) and autoclaved metabolites (AM) of five isolates of *Trichoderma harzianum* were evaluated. Bean seeds cv. Pérola contaminated with *C. herbarum* were treated with CS and AM of *T. harzianum*, and subsequently submitted to health and germination tests. Normal seedling number, length of root, hypocotyls and leaf, and total length, total biomass, root mass ratio (RMR), stem mass ratio (SMR), leaf mass ratio (LMR), aerial part/root system ratio (AP/RS) and leaf area were evaluated. Isolates CEN289 and CEN290 (CS and AM) provided 66 to 77% of control of *C. herbarum* on the common bean seeds and a higher number of normal seedlings compared to the control treatment, as well as the highest total biomass. Moreover the isolates CEN289 and CEN290 improved root and stem length in the experiments with CS. Our results demonstrated the potential of *T. harzianum* in controlling *C. herbarum* on common bean seeds and increasing the biomass accumulation and the vegetative growth of seedlings treated with the isolates CEN289 and CEN290.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, antagonism, biological control, seed pathology.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é a mais importante fonte de proteína para a alimentação humana em vários países, principalmente na América Latina e na África. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa. Assim, o feijão comum é um dos componentes básicos da dieta da população brasileira (Alwathnani et al., 2012).

A incidência de patógenos em sementes de feijão pode causar perdas na qualidade fisiológica das sementes, com consequências sobre a sua germinação e no estabelecimento do estande inicial (Carvalho et al., 2011b). Além disso, as sementes são um importante veículo para a introdução e disseminação de patógenos em novas regiões. Devido à falta de manejo adequado, os produtos agrícolas, como sementes de feijão, podem ser expostos à umidade e temperaturas inadequadas durante o armazenamento, permitindo o crescimento de fungos (Costa e Scussel, 2002). Fungos do gênero *Cladosporium* quando associados a sementes de feijão durante o armazenamento são capazes de infligir danos na germinação, especialmente quando estas não são tratados (Dhingra et al., 2002).

O tratamento de sementes pode eliminar os patógenos e protegê-las contra doenças após a semeadura, sendo fundamental para se obter um adequado estabelecimento da cultura (Carvalho et al., 2011a). Embora os fungicidas são usados para controlar os patógenos das sementes, os resultados são temporários e não persistente ao longo do tempo (Salman e Abuamsha, 2012). Além disso, fungicidas e outros produtos químicos apresentam aspectos negativos, tais como a contaminação da saúde humana e do meio ambiente com resíduos tóxicos (Carvalho et al., 2007), bem como o desenvolvimento de populações de patógenos resistentes aos fungicidas (Maketon et al., 2008). Assim, o controle biológico de doenças de plantas, pela utilização de microrganismos antagonistas (isoladamente ou em combinação com produtos químicos), é visto como um manejo muito bem-vindo. (Salman e Abuamsha, 2012). O controle biológico com *Trichoderma* pode reduzir o número de aplicações de fungicidas químicos e possivelmente eliminar esta prática, dependendo das condições ambientais, a gravidade da doença, e do manejo. O tratamento químico de sementes pode ser totalmente substituído pelo tratamento biológico, trazendo benefícios econômicos, sociais e ambientais (Carvalho et al., 2011a).

Alguns isolados de *Trichoderma* podem estimular o desenvolvimento das plantas, devido à colonização rizosférica (Hoyos-Carvajal et al., 2009), produção de substâncias que estimulam o crescimento das plantas, e solubilização dos nutrientes próximas das raízes, permitindo que estas substâncias sejam assimiladas pelas plantas (Jha et al., 2013). Portanto, o efeito do antagonista sobre o crescimento das plantas é uma característica importante para a seleção de agentes de controle biológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de

*Trichoderma harzianum* para o controle do patógeno *Cladosporium herbarum* em sementes de feijão e na promoção do crescimento inicial de plântulas de feijão comum cv. 'Pérola'.

## 2 MATERIAIS E METODOS

### 2.1 Isolados de *Trichoderma harzianum*

Cinco isolados de *T. harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) pertencentes à coleção de fungos para o controle biológico de patógenos de plantas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram avaliados. Os isolados foram identificados em bases de características morfológicas (Samuels et al., 2014) e sequenciamento das regiões ITS-1 e ITS-4 do rDNA. Os experimentos foram realizados na Universidade Estadual de Goiás, Ipameri, Goiás, Brasil.

### 2.2 Multiplicação de *Trichoderma harzianum* em substrato sólido

Para a obtenção do inóculo, discos de ágar foram retirados ao sete dias de cultivo e, transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL (4 discos/frasco), contendo arroz parboilizado (15 g/frasco), previamente umedecido (60% p v<sup>-1</sup>) e autoclavado (121° C; 40 min). Os frascos foram mantidos a 25 °C e 12h de luz. Após seis dias de incubação, adicionou-se água destilada esterilizada (ADE) aos frascos para, em seguida, recolher os esporos, que foram filtrados em gaze esterilizada. A concentração de conídios foi ajustada por meio de uma câmara de Neubauer.

### 2.3 Produção de metabólitos autoclavados de *Trichoderma harzianum*

Cada isolado de *T. harzianum* foi cultivado em 250 mL de meio batata-dextrose (BD) em Erlenmeyer de 500 mL a 120 rpm em agitador orbital (Quimis<sup>®</sup> Aparelhos Científicos Ltda., Q225K) a 25°C e 12h de luz, durante seis dias. Depois disso, os isolados foram filtrados e autoclavados a 121°C durante 21 min.

### 2.4 Detecção de *Cladosporium herbarum* em sementes tratadas com conídios e metabólitos autoclavados de *Trichoderma harzianum*

Sementes de feijão cv. 'Pérola' naturalmente infectadas com *C. herbarum* foram tratadas com (a) 2 mL a 2,5 x 10<sup>8</sup> de suspensão de conídios mL<sup>-1</sup> de *T. harzianum* para 100 g de sementes e (b), 2 mL de metabólitos autoclavados de *T. harzianum* para 100 g de sementes. Logo após, os testes de sanidade foram realizados utilizando o método do papel de filtro, onde 25 sementes tratadas foram colocadas em caixa acrílicas transparentes (gerbox - 11 x 11 cm) e incubadas a 25°C e 98% de umidade relativa e 12 h de luz, durante sete dias.

Cada semente foi examinada individualmente em microscópio estereoscópico. Para confirmar a presença de *C. herbarum*, lâminas semi-permanentes contendo material biológico, foram preparadas e analisadas em microscópio de luz Leica DM500. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizados (DIC), com oito repetições de 25 sementes por tratamento. Sementes tratadas com Carboxin+Thiram (300 ml 100 kg<sup>-1</sup> de sementes, 200 g L<sup>-1</sup> de Carboxin e 200 g L<sup>-1</sup> de Thiram) e sementes não tratadas foram utilizadas como controles positivos e negativos, respectivamente. Meio BD autoclavado foi utilizado como controle negativo no teste com metabólitos.

## **2.5 Germinação e crescimento de feijão tratados com conídios e metabólitos autoclavados de *Trichoderma harzianum***

Este teste foi realizado com os mesmos tratamentos e dosagens acima mencionados, com exceção do tratamento químico, o qual não foi empregado. Assim, depois de tratadas, as sementes foram colocadas em papel germitest (50 sementes rolo<sup>-1</sup>) e acondicionadas em germinador (Logen Scientific<sup>®</sup>), a 25°C, durante nove dias. As avaliações foram realizadas da seguinte forma: (a) porcentagem de plântulas anormais (mudas expondo necrose ao longo das radículas, hipocótilos e cotilédones, radículas seminais e secundárias raquíticas e mal formadas ou radículas secundárias ausentes), (b) plântulas normais (ausência de necrose e patógeno nas plântulas, raízes seminais e secundárias sem deformações) e (c) de sementes mortas. Além disso, todas as plântulas normais de cada tratamento foram, separadamente, medidas como se segue: (a) comprimento da raiz, (b) comprimento do hipocótilo, (c), comprimento das folhas e (d) o comprimento total (a+b+c).

## **2.6 Variáveis de crescimento**

A área foliar foi calculada utilizando-se dos dados de largura e comprimento da folha segundo equação proposta por Figueiredo et al. (2012). Em seguida, as folhas, raízes e caules foram destacados e secados em estufa a 72°C até atingir massa seca constante para se obter os valores (em gramas) de massa seca da raiz (msr), massa seca do caule (msc) e massa seca da folha (msf). Assim, a partir dos dados de massa seca, calculou-se a biomassa total (msr+msc+msf), razão de massa da folha [RMF=(msf)/(biomassa total)], razão de massa da raiz [RMR=(msr)/(biomassa total)], razão de massa do caule [RMC=(msc)/(biomassa total)] e razão parte aérea/sistema radicular [PA/SR=(msc+msf)/(msr)]. Outra componente dentre as variáveis de crescimento foi a área foliar (cm<sup>2</sup>).

## 2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ), utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2011). Todos os experimentos foram realizados duas vezes.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Detecção de *Cladosporium herbarum* em sementes tratadas com conídios e metabólitos autoclavados de *Trichoderma harzianum* e germinação de sementes de feijão

O fungicida Carboxin+Thiram foi o melhor tratamento para o controle de *C. herbarum* nas sementes de feijão comum cv. 'Pérola', proporcionando 100% de controle do patógeno nos dois casos (SC: suspensão de conídios e MA: metabólitos autoclavados) (Tabela 1). Com relação ao uso da SC, o controle de *C. herbarum* variou de 67 a 77% para os isolados de *T. harzianum*. Já para o uso do metabólito autoclavado, apenas os isolados CEN289 e CEN290 proporcionaram controle acima de 70% (75 e 73%, respectivamente). Novamente, os isolados CEN289 e CEN290 foram os que proporcionaram o maior número de plântulas normais, nos dois experimentos (SC e MA). Para estes dois isolados, o número de plântulas normais foi 62% e 36% maior que o controle, nos experimentos SC e MA, respectivamente.

**Tabela 1.** Incidência de *Cladosporium herbarum* em sementes de feijão cv. 'Pérola', tratadas com suspensão de conídios (SC) de *Trichoderma harzianum* e seus metabólitos autoclavados (MA), e o respectivo efeito de cada tratamento sobre a formação de plântulas normal, Ipameri, Goiás, Brazil, 2013<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Incidência de <i>Cladosporium herbarum</i> (%)		Plântulas normais <sup>(2)</sup>	
	SC	MA	SC	MA
CEN287	31,0 c	22,5 c	43,7 b	42,7 a
CEN288	25,5 b	27,0 c	42,0 b	40,7 b
CEN289	23,0 b	14,5 b	46,5 a	43,7 a
CEN290	22,5 b	16,0 b	46,0 a	43,7 a
CEN316	21,0 b	26,5 c	41,2 b	41,2 b
Carboxin+Thiram <sup>(3)</sup>	0 a	0 a	-	-
Testemunha	94,0 d	59,5 d	28,7 c	32,0 c
BD <sup>(4)</sup>	-	73,0 e	-	33,0 c
CV (%)	20,14	22,49	4,02	3,28

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>(2)</sup>Sementes naturalmente infestadas por *Cladosporium herbarum*.

<sup>(3)</sup>Carboxin+Thiram (300 mL por 100 kg de sementes; 200 g L<sup>-1</sup> de carboxin e 200 g L<sup>-1</sup> de thiram)

<sup>(4)</sup> Batata-Dextrose (200g de batata cozida, 20g de Dextrose, 1000 ml de água destilada).

### 3.2 Crescimento (cm) de feijão tratados com conídios e metabólitos autoclavados de *Trichoderma harzianum*

Com relação ao comprimento das plântulas originadas, observou-se que somente os isolados CEN289 e CEN290, diferiram dos demais quanto ao comprimento das raízes (12,57 e 13,31 cm, respectivamente; controle: 8,94 cm) e do caule (9,10 e 8,77 cm, respectivamente; controle: 7,05 cm) nos experimentos utilizando a SC, o qual foi limitante para a separação de isolados, visto que nos experimentos com MA, maior quantidade de isolados apresentavam-se estatisticamente similar a CEN289 e CEN290 (Tabela 2). Com relação ao comprimento das folhas, os isolados CEN287 (1,63 e 1,43 cm), CEN289 (1,56 e 1,45 cm) e CEN316 (1,60 e 1,62 cm) diferiram dos demais tratamentos (controle: 1,12 e 1,09 cm) nos experimentos com SC e MA, respectivamente. Já para o comprimento total, apenas o teste com SC permitiu separar os isolados, em que os isolados CEN287 (21,33 cm), CEN289 (23,98 cm) e CEN290 (22,78 cm) foram superiores aos demais tratamentos, incluindo o controle (17,14 cm).

Os valores de comprimento de raiz foram maiores no experimento com SC para todos os isolados de *T. harzianum*. Tal evento não foi observado para o comprimento de caule e das folhas. Já para o comprimento total, valores obtidos foram maiores no experimento com SC para todos os isolados de *T. harzianum*, exceto CEN316.

**Tabela 2.** Comprimento (cm) da raiz, hipocótilo, folhas e comprimento total de plântulas de feijão comum cv. 'Pérola' tratadas com suspensão de conídios (SC) de *Trichoderma harzianum* e seus metabólitos autoclavados (MA), Ipameri, Goiás, Brasil, 2013<sup>(1)</sup>.

Tratamento	comp. raiz		comp. hipocótilo		comp. folha		comp. tota	
	SC	AM	SC	AM	SC	AM	SC	AM
CEN287	11,76 bA	9,89 aB	7,94 bA	6,93 <sup>ns</sup> A	1,63 aA	1,43 aA	21,33 aA	18,25 <sup>ns</sup> B
CEN288	11,22 bA	7,37 bB	7,38 bA	5,85 A	1,41 bA	1,41 aA	20,02 bA	14,63 B
CEN289	12,57 aA	9,59 aB	9,10 aA	7,56 A	1,56 aA	1,45 aA	23,98 aA	18,60 B
CEN290	13,31 aA	8,71 aB	8,77 aA	6,33 B	1,43 bA	1,23 bA	22,78 aA	16,27 B
CEN316	11,27 bA	9,57 aB	7,41 b A	7,04 A	1,60 aA	1,62 aA	20,29 bA	18,23 A
Testemunha	8,94 cA	7,99 bA	7,05 b A	5,68 A	1,12 cA	1,09 bA	17,14 cA	14,76 A
BD <sup>(2)</sup>	-	7,68 b	-	7,68	-	1,15 b	-	16,51
CV (%)	7,30	14,11	12,82	21,98	8,63	14,27	8,39	16,78

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna e da mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>(2)</sup>Batata-Dextrose (200g de batata cozida, 20g de Dextrose, 1000 ml de água destilada).

### 3.3 Variáveis de crescimento

Em relação a análise de crescimento, novamente, os isolados CEN289 e CEN290 foram os que proporcionaram maior biomassa total no experimento com SC (127,45 e 117,91 g, respectivamente), sendo estatisticamente superiores ao controle (95,23 g) e, principalmente, no experimento com MA, onde os valores de biomassa total foram de 133,43; 128,13 e 70,39 g para os isolados CEN289, CEN290 e controle, respectivamente (Tabela 3).

A razão de massa da raiz (RMR) das plântulas tratadas com os isolados de *T. harzianum* (a qual variou de 0,07 a 0,16) apresentaram valores inferiores ao controle para os experimentos com SC e MA (0,31 e 0,28, respectivamente). Já a razão de massa do caule (RMC) das plântulas tratadas com os isolados de *T. harzianum* (a qual variou de 0,80 a 0,89) apresentaram valores superiores ao controle para os experimentos com SC e MA (0,65 e 0,66, respectivamente).

Com relação a razão de massa da folha (RMF), todos os isolados de *T. harzianum* proporcionaram menor valor nos dois experimentos (SC e MA), exceto o isolado CEN287, o qual foi similar ao controle. A razão parte aérea/sistema radicular (PA/SR) para as plântulas, cujas sementes foram tratadas com SC e MA de *T. harzianum* (PA/SR variou de 9,02 a 13,42) foi superior ao controle (2,18 e 2,58, respectivamente). Única exceção foi o isolado CEN287 no experimento com MA, cujo valor de PA/SR (5,35) foi similar ao controle. A área foliar (cm<sup>2</sup>) das plântulas tratadas com SC e MA, respectivamente, de CEN287 (3,65 e 3,42), CEN289 (3,50 e 3,26) e CEN316 (3,52 e 3,43) foram superiores ao controle (2,91 e 2,87). Para as variáveis de crescimento (Tabela 3), nenhuma diferença foi observada para os tratamentos na mesma linha, ou seja, entre os experimentos com SC e MA. Para as Tabelas 1, 2 e 3, o controle BD, utilizado nos experimentos com MA, comprovou que o meio de cultura para obtenção dos MA, não possui interferência nos resultados.

**Tabela 3.** Biomassa total (g), razões de massa da raiz (RMR), do caule (RMC), da folha (RMF), razão parte aérea/sistema radicular (PA/SR) e área foliar (cm<sup>2</sup>) em plântulas de feijão comum cv. ‘Pérola’ tratadas com suspensão de conídios (SC) de *Trichoderma harzianum* e com metabolitos autoclavados (MA), Ipameri, Goiás, Brazil, 2013<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Biomassa total (g) <sup>(2)</sup>		RMR <sup>(3)</sup>		RMC <sup>(4)</sup>		RMF <sup>(5)</sup>		PA/SR <sup>(6)</sup>		Área foliar (cm <sup>2</sup> )	
	SC	MA	SC	MA	SC	MA	SC	MA	SC	MA	SC	MA
CEN287	91,02 b	84,34 c	0,08 b	0,16 c	0,87 a	0,80 b	0,03 a	0,03 c	10,52 a	5,35 b	3,65 a	3,42 a
CEN288	108,61 a	120,37 b	0,09 b	0,08 d	0,88 a	0,89 a	0,02 b	0,02 c	10,70 a	12,92 a	3,32 b	3,33 a
CEN289	127,45 a	133,43 a	0,09 b	0,09 d	0,88 a	0,88 a	0,02 b	0,02 c	9,89 a	9,98 a	3,50 a	3,26 a
CEN290	117,91 a	128,13 a	0,09 b	0,09 d	0,87 a	0,88 a	0,02 b	0,02 c	9,02 a	9,59 a	3,29 b	2,94 b
CEN316	116,44 a	113,54 b	0,08 b	0,07 d	0,88 a	0,89 a	0,02 b	0,02 c	10,58 a	13,42 a	3,52 a	3,43 a
Testemunha	95,23 b	70,39 d	0,31 a	0,28 a	0,65 b	0,66 d	0,03 a	0,05 b	2,18 b	2,58 b	2,91 c	2,87 b
BD <sup>(7)</sup>	-	108,71 b	-	0,22 b	-	0,69 c	-	0,07 a	-	3,37 b	-	2,96 b
CV (%)	11,07	7,78	14,71	15,16	2,45	2,33	15,93	27,34	24,98	31,92	4,67	7,79

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>(2)</sup>Biomassa total (msr+msc+msf).

<sup>(3)</sup>Razão de massa da raiz [RMR=(msr)/(biomassa total)].

<sup>(4)</sup>Razão de massa do caule [RMC=(msc)/(biomassa total)].

<sup>(5)</sup>Razão de massa da folha [RMF=(msf)/(biomassa total)].

<sup>(6)</sup>Razão parte aérea/sistema radicular [PA/SR=(msc+msf)/(msr)].

<sup>(7)</sup>Batata-Dextrose (200g de batata cozida, 20g de Dextrose, 1000 ml de água destilada).

## 4 DISCUSSÃO

Segundo Barbosa et al., (2001), a ação antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *C. herbarum* ocorre por meio de hiperparasitismo direto, tal como a esporulação do antagonista dentro das hifas do patógeno. Além disso, uma possível explicação para o efeito dos MA, reside no fato de que espécies de *Trichoderma* podem produzir antibióticos tóxicos às hifas de diversos patógenos (trichodermin, trichodermol, harzianum A and harzianolide) e enzimas degradadoras da parede celular de fungos, tais como: lipase, NAGase,  $\beta$ -1,3-glucanase,  $\beta$ -glucosidase e protease (Dickinson et al., 1995; Geraldine et al., 2013).

Similarmente, Carvalho et al. (2011a) relataram grande eficácia no biocontrole de *Cladosporium* sp. em sementes de feijão comum, com o uso de Carboxin+Thiram, responsável por 100% redução do patógeno, enquanto que o tratamento biológico diminuiu entre 14 e 41% a incidência do patógeno nas sementes. No presente trabalho, os índices de redução da incidência de *C. herbarum* em sementes contaminadas (SC: redução entre 67 e 77%; MA; redução entre 54 e 75%) foram maiores que no trabalho anteriormente citado, sugerindo que tal diferença de desempenho se deve à diferenças na população do fitopatógeno que ocorriam naturalmente nas sementes infestadas, uma vez que nos dois trabalhos, os isolados de antagonistas são os mesmos.

Curiosamente, os isolados CEN289 e CEN290 diferenciaram-se dos demais quanto ao percentual de plântulas normais nos dois experimentos (SC e MA). A coincidência deste resultado com o obtido na avaliação da incidência de *C. herbarum* nas sementes quando do emprego de MA, sugere que metabólitos produzidos por estes dois isolados, estão envolvidos na obtenção de maior percentual de plântulas normais. No caso específico, tais metabólitos foram aplicados diretamente (no experimento com MA) e indiretamente (no experimento com SC), refletindo o mesmo resultado quando observado o percentual de plântulas normais.

Segundo Saito et al. (2011), a promoção de crescimento em plantas ocasionada por *Trichoderma* ocorre devido à ação de vários fatores ainda poucos esclarecidos. Após o teste de médias em que se comparou o efeito do tipo de experimento utilizado (SC ou MA) para cada tratamento, verificou-se que, para todos os isolados, os valores de comprimento de raiz foram maiores no experimento com SC do que no experimento com MA. Assim, no caso do teste em rolo papel, pode ter ocorrido a produção de hormônios e de vitaminas estimuladoras do crescimento vegetal, a qual só foi possível no experimento com SC, quando do emprego de conídios vivos em temperatura ambiente (25°C). Ou seja, frações ativas presentes nos metabólitos produzidos em meio BD podem ter sido decompostas em frações inativas após autoclavagem dos metabólitos.

Desta forma, o aumento do comprimento radicular da planta, é acompanhado do aumento do comprimento total em culturas que são tratadas com *Trichoderma* spp. (Saito et al., 2011; Carvalho et al., 2011a; Carvalho et al., 2011b). Além disso, vale ressaltar que os fungos são favorecidos pela presença de níveis elevados de raízes, as quais estes colonizam facilmente (Harman, 2000). Algumas cepas são altamente capazes de colonizar e crescer em raízes do mesmo modo como elas se desenvolvem. Isto é, os isolados que colonizam melhor as raízes podem ser adicionadas ao solo ou em sementes por qualquer método. E, depois de que estas entram em contato com as raízes, colonizam a superfície da raiz ou córtex, dependendo do isolado (Harman et al., 2004), exibindo a propriedade de rizocompetência, já demonstrada para os isolados CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316 (Carvalho et al., 2011a).

O curto período de exposição das plântulas à SC e MA dos isolados CEN287, CEN289 e CEN316 de *T. harzinaum* foi suficiente para desencadear significativas alterações na lamina foliar e, principalmente, na biomassa total das plântulas de feijoeiro. Assim, a análise de crescimento constitui ferramenta eficiente na identificação de materiais promissores, além de identificar características que, no crescimento inicial, indiquem possibilidade de aumento no rendimento da planta adulta (Peixoto et al., 2006), fato que foi observado para os isolados CEN289 e CEN290, avaliando-se a biomassa total. As plântulas tratadas com SC e MA de *T. harzianum* apresentaram elevado acúmulo de biomassa e maior desenvolvimento da parte aérea, em especial, do caule (RMC). A biomassa total é importante variável para a seleção de materiais promissores para plantio em campo (Nobre et al., 2011; Matos et al., 2012). Assim, o maior acúmulo de biomassa em plântulas tratadas com CEN289 esteve em consonância com maior área foliar fotossintetizante.

Em conformidade com os dados da tabela 2, Carvalho et al. (2011a) realizou experimentos com os mesmos isolados de *T. harzianum* em plantas de feijão comum cv. 'Jalo Precoce' em condições de casa de vegetação e campo, onde os isolados CEN289 e CEN290 apresentaram maior comprimento do sistema radicular do que o controle. De forma oposta, a reduzida alocação de biomassa para o sistema radicular em plântulas tratadas com SC e MA de *T. harzianum* ocorreu em função da elevada disponibilidade de água para as plântulas irrigadas diariamente no teste com rolo de papel e, dessa forma, não havendo restrição hídrica, a disponibilização de recursos para formação de sistema radicular profundo e robusto não foi justificada. Consequentemente, a elevada razão PA/SR das plântulas tratadas com SC e MA de *T. harzianum* ocorreu em função da intensa alocação de biomassa para a parte aérea.

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho que o tratamento de sementes de feijão comum cv. 'Pérola' com *Trichoderma harzianum* reduz a incidência de *C. herbarum*, ocasionando melhor sanidade das plântulas obtidas. A promoção do crescimento das raízes só é possível quando do emprego de conídios vivos em temperatura ambiente (25°C) e não de seus metabólitos autoclavados. Plântulas oriundas de sementes tratadas com os isolados de *T. harzianum*, principalmente CEN289 e CEN290, apresentaram intenso acúmulo de biomassa e crescimento vegetativo vigoroso, podendo alcançar a maturidade em menor espaço de tempo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo suporte financeiro (Processo 201310267001026). À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelos isolados de *Trichoderma harzianum* (TRTM 02/2012). E à Universidade Estadual de Goiás (UEG) pelo apoio recebido na elaboração do artigo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALWATHNANI, H.A.; PERVEEN, K.; TAHMAZ, R.; ALHAQBANI, S. Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under in vitro and pot conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.312-319, 2012.
- BARBOSA, M.A.G.; REHN, K.G.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.98-104, 2001.
- CARVALHO, D.D.C.; 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, p.822-828, 2011a.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.028-034, 2011b.
- CARVALHO, D.D.C.; OLIVEIRA, D.F.; CORRÊA, R.S.B.; CAMPOS, V.P.; GUIMARÃES, R.M.; COIMBRA, J.L. Rhizobacteria able to produce phytotoxic metabolites. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.759-765, 2007.
- COSTA, L.L.F.; SCUSSEL, V.M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.138-144, 2002.
- DHINGRA, O. D., MAIA, C. B.; LUSTOSA, D. C.; MESQUITA, J. B. Seed borne pathogenic fungi that affect Seedling Quality of Red Angico (*Anadenanthera macrocarpa*) trees in Brazil. **Journal of Phytopatology**, v.150, p.451-455, 2002.

DICKINSON, J.M.; HANSON, J.R.; TRUNEH, A. Metabolites of some biological control agents. **Pesticide Science**, v.44, p.389-393, 1995.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, E.S.; SANTOS, M.E.; GARCIA, A. Modelos de determinação não destrutivo da área foliar do feijoeiro comum *Phaseolus vulgaris* L. **Nucleus**, v.9, n.1, p.79-84, 2012.

GERALDINE, A.M.; LOPES, F.A.C.; CARVALHO, D.D.C.; BARBOSA, E.T.; RODRIGUES, A.R.; BRANDÃO, R.S.; ULHOA, C.J.; LOBO JUNIOR, M. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v.67, p.308-316, 2013.

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

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

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

JHA, P.N.; GUPTA, G.; JHA, P.; MEHROTRA, R. Association of Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable Agriculture. **Greener Journal of Agricultural Sciences**, v.3, n.2, p.073-084, 2013.

MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.296-300, 2008.

MATOS, F.S.; GAMBOA, I.; RIBEIRO, R.P.; MAYER, M.L.; NEVES, T. G.; LEONARDO, B. R. L.; SOUZA, A, C. Influência da intensidade luminosa no desenvolvimento de mudas de *Jatropha curcas* L. **Agrarian**, v.4, n.14, p.265-272, 2012.

NOBRE, R.G.; GHEYI, H.G.; SOARES, F.A.L.; CARDOSO, J.A.F. Produção de girassol sob estresse salino e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.35, p.929-937, 2011.

PEIXOTO, C.P.; CERQUEIRA, E.C.; SOARES FILHO, W.S.; CASTRO NETO, M. T.; LEDO, C.A.S.; MATOS, F.S.; OLIVEIRA, J.G. Análise de crescimento de diferentes genótipos de citros cultivados sob déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.439-443, 2006.

SAITO, L. R.; SALES, L.L.D.R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.2, n.3 p. 203-208, 2011.

SALMAN, M.; ABUAMSHA, R. Potential for integrated biological and chemical control of damping-off disease caused by *Pythium ultimum* in tomato. **Biological Control**, v.57, p.711-718, 2012.

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/Trichoderma\\_Index.cfm](http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/Trichoderma_Index.cfm)>. Acesso em 07 de janeiro de 2014.

## CONCLUSÕES GERAIS

Cinco isolados de *Trichoderma harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) pertencentes a Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF) foram testados quanto ao antagonismo ao fungo *Cladosporium herbarum* e como promotores de crescimento de plântulas de feijão comum. A seguir, são apresentadas as conclusões gerais para todas as componentes exploradas no decorrer destes estudos:

1 - A interação hospedeiro-patogeno cultivar de feijão 'Pérola' e *C. herbarum* favorece a incidência elevada. Baseando-se nas características culturais e micromorfológicas dos conídios encontrados, o fungo encontrado trata-se de *C. herbarum* em sementes de feijão.

2 - O isolado CEN287 exerce o hiperparasitismo sobre *C. herbarum*, sendo este o mais evidente mecanismo de controle biológico exercido por este isolado sobre o patógeno. O ótimo de temperatura de crescimento de *T. harzianum* é de 25°C, independentemente de isolado.

3 - Quanto à produção de metabólitos voláteis ao patógeno, o isolado CEN288 inibiu em 59% o crescimento de *C. herbarum*, enquanto que para metabólitos não voláteis termoestáveis, todos os isolados foram similares entre si, inibindo entre 29 e 40% o crescimento do patógeno.

4 - O tratamento das sementes sadias com *T. harzianum* a 2 mL de suspensões dos antagonistas ( $2,5 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) 100 g<sup>-1</sup> sementes não afeta o desenvolvimento das plântulas.

5 - Plântulas oriundas de sementes tratadas com os isolados de *T. harzianum*, principalmente CEN289 e CEN290, apresentaram intenso acúmulo de biomassa e crescimento vegetativo vigoroso, podendo alcançar a maturidade em menor espaço de tempo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALWATHNANI, H. A., PERVEEN, K., TAHMAZ, R. & ALHAQBANI, S. Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under *in vitro* and pot conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.312-319, 2012.
- AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista eletrônica de farmácia**, v.2, p.5-8. 2005.
- BARBOSA, F. R. & GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Documentos, 247p.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; GERALDINE, A.M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.822-828, 2011a.
- CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, Quarto levantamento, janeiro 2014**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. Conab. 2014. 41 p.
- CONSOLO, V.F.; MONACO, C.I.; CORDO, C.A.; SALERNO, G.L. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28,p.1389-1398, 2012.
- DINIZ, K. A.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARAES, R.M.; CARVALHO, M.L.M.; MACHADO, J.C. Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**. v.28, p.37-43, 2006.
- FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALLES, S.L.M.; QUEIRÓZ, S.R.R.; HELNY NETO, N.E.; CORAZZA, R.; FARIAS, R.C. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998, 131p.
- HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 377-393, 2000.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**. v. 2, p. 43-56, 2004.
- HOAGLAND, R.E. Chemical Interactions with Bioherbicides to Improve Efficiency. **Weed Technology**, v. 10, p. 651-674, 1996.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, p. 409-416, 2009.
- ITO, M.F.; CASTRO, J.L.; MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D. Importância do uso de sementes sadias de feijão e tratamento químico. **O Agrônomo**, v.55, p.14-16, 2003.

- MAHAMUNE, S. E.; KAKDE, R.B. Incidence of seed-borne mycoflora on French bean mutants and its antagonist activity against *Trichoderma harzianum*. **Plant Pathology**, v.3, p.62-67, 2011.
- MARINO, R.H.; MESQUITA, J.B. Micoflora de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do Estado de Sergipe. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, p.252-256, 2009.
- MATHIVANAN, N.; PRABAVATHY, V.R.; VIJAYANANDRAJ, V.R. Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield in rice. **Journal of Phytopathology**, v.153, p.697-701, 2005.
- MCFAYDEN, R.E.C. Biological Control of Weeds. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 369-393, 1998.
- PEREIRA, F.S.; BORGES, L.P.; GUIMARAES, G.R.; SILVA, A.; GONÇALVES, R. N.; TEIXEIRA, I.R. Estratégias de controle de mofo branco do feijoeiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, p.1354, 2013.
- SAITO, L.R.; SALES, L.L.S.R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M.S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, 2009.
- VINALE, F.; D'AMBROSIO, G.; ABADI, K.; SCALA, F.; MARRA, R.; TURRA, D.; WOO, S.L.; LORITO, M. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. **Journal of Zhejiang University Science**, v.30, p.2-8, 2004.
- ZUCCHI, T.D.; MELO, I.S. de. Controle biológico de fungos aflatoxigênicos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, pp.69-94, 2009.