



ARTIGO

Relações entre testes com metabólitos e seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotinia sclerotiorum*

Gisele Angélica de Souza Louzada¹, Hellen Nogueira Barbosa², Daniel Diego Costa Carvalho², Irene Martins⁴, Murillo Lobo Junior³ e Sueli Corrêa Marques Mello^{4*}

Recebido: 17 de outubro de 2014 Recebido após revisão: 14 de maio de 2015 Aceito: 14 de maio de 2015
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/scerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3191>

RESUMO: (Relações entre testes com metabólitos e seleção de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotinia sclerotiorum*). Fungos do gênero *Trichoderma* possuem versatilidade de ação, atuando por mecanismos diretos e/ou indiretos. Em face disto, a análise multivariada tem sido utilizada com o objetivo de sintetizar e identificar correlações entre os diferentes mecanismos relacionados ao controle biológico. Este trabalho teve como objetivo avaliar o antagonismo de 16 isolados de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotinia sclerotiorum* e identificar as variáveis que melhor explicam a ação antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o patógeno, *in vitro*. Para tanto, os isolados foram confrontados com o patógeno em cultura pareada (CP), e tiveram seus metabólitos avaliados sobre o crescimento do patógeno nos ensaios de metabólitos voláteis (MV), termo-lábeis (MTL) e não termo-lábeis (MNTL). O isolado CEN654, permitiu apenas 17,1; 9,5 e 0,3% de crescimento do patógeno em relação à testemunha nos experimentos com MV, MTL e MNTL, respectivamente, destacando-se dos demais na análise de componentes principais (ACP). Além disso, a ACP indica que os testes de CP e MTL são critérios mais adequados para a seleção *in vitro* de isolados antagonísticos a *S. sclerotiorum* do que os testes com MV e MNTL.

Palavras-chave: controle biológico, antagonismo, mofo branco, análise multivariada.

ABSTRACT: (The relationship between metabolite assays and the selection of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum*). Fungi of the *Trichoderma* genus have a versatility of action, as they can act by direct and/or indirect mechanisms. In view of this, multivariate analysis has been used in order to summarize and identify correlations among different mechanisms of biological control. We aimed to evaluate the antagonism of 16 *Trichoderma* spp. isolates against *Sclerotinia sclerotiorum* and identify the variables that best explain the antagonistic activity of *Trichoderma* spp. isolates against the pathogen *in vitro*. For that, isolates were confronted with the pathogen in paired culture (PC) and had the effect of their metabolites on the pathogen growth evaluated in volatile (VM), thermolabile (TLM), and non-thermolabile metabolite (NTLM) assays. Isolate CEN654 allowed only 17.1, 9.5, and 0.3% of pathogen growth in relation to the control in the VM, TLM, and NTLM assays respectively, standing out from the other isolates in the principal component analysis (PCA). The PCA also suggested that the PC and TLM assays are more suitable for the *in vitro* selection of isolates with antagonistic activity against *S. sclerotiorum* than the VM and NTLM ones.

Keywords: biological control, antagonism, white mold, multivariate analysis.

INTRODUÇÃO

Entre os vários fatores que limitam a produtividade do feijoeiro, destacam-se as doenças causadas por patógenos habitantes do solo, a exemplo do mofo branco (Geraldine *et al.* 2013), causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884). Identificado pelo micélio cottonoso branco que cresce nas superfícies dos tecidos infectados, ou por outros sintomas como murcha e podridão, o mofo branco é responsável por sérios prejuízos à produção nacional, causando perdas de até 100% quando as condições de clima encontram-se favoráveis para o seu desenvolvimento, particularmente com temperaturas amenas (20 a 25 °C) e alta umidade (Carneiro *et al.* 2011).

Medidas de controle como o uso de variedades resistentes, fungicidas químicos e microrganismos antagonistas podem funcionar bem quando empregadas de forma integrada (Barbosa & Gonzaga 2012). Porém, o controle biológico de fitopatógenos apresenta uma série

de vantagens em relação ao uso de fungicidas químicos, por empregar agentes capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema, diminuindo o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao meio ambiente (Mello *et al.* 2007). Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* estão entre os antagonistas mais utilizados contra diversos patógenos, com vários relatos de sucesso para seu uso. Considerado não-tóxico e biodegradável, é um importante agente de biocontrole de doenças de plantas, inclusive em relação ao controle do mofo branco (Castillo *et al.* 2011, Paula Júnior *et al.* 2012, Botelho *et al.* 2013).

Fungos do gênero *Trichoderma* possuem versatilidade de ação inibidora, atuando por mecanismos diretos e/ou indiretos, dos quais, destacam-se: a antibiose, que é a inibição ou supressão do patógeno pela produção de diversas substâncias tóxicas, metabólitos voláteis e não voláteis, como os ácidos harziânico e heptelídico, e enzimas tais

1. Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília (UnB). CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil.

2. Laboratório de Fitopatologia, Universidade Estadual de Goiás (UEG). Rodovia GO 330, km 241, Anel Viário, Setor Universitário, CEP 75780-000, Ipameri, GO, Brasil.

3. Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão. CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil.

4. Prédio de Controle Biológico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. CP 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: sueli.mello@embrapa.br

como alameticinas, tricholinas e glisopreninas (Reino et al. 2008); a competição, pela qual o antagonista disputa nutrientes e/ou espaço com o patógeno, impedindo o processo de infecção da planta; e o hiperparasitismo, pelo qual o antagonista degrada a parede celular do patógeno pela secreção de enzimas líticas (Carvalho et al. 2011a, Carvalho et al. 2011b). A ação por diferentes mecanismos pode ocorrer simultaneamente, potencializando a ação antagonista (Morandi & Bettiol 2009).

A análise de componentes principais (ACP) tem sido utilizada com o objetivo de sintetizar e identificar correlações entre os diferentes mecanismos relacionados ao controle biológico, possuindo como vantagem a redução da dimensionalidade de variáveis analisadas, eliminando sobreposições e fornecendo uma visualização mais precisa dos potenciais agentes de biocontrole, explicando os padrões obtidos (Geraldine et al. 2013, Carvalho et al. 2014). Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o antagonismo de 16 isolados de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum* e identificar as variáveis que melhor explicam a ação antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o patógeno, *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados dos antagonistas e patógeno

Os 16 isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no presente estudo foram selecionados a partir de um total de 230 isolados coletados em diferentes áreas geográficas e ecossistemas (Tab. 1) por Louzada et al. (2009) e integrados à Coleção de Agentes de Biocontrole de Fito-patógenos e Plantas Daninhas da Embrapa (autorização especial nº 02/2008, Processo 02001.006479/2010-93).

Já o isolado de *S. sclerotiorum* foi obtido da coleção de trabalho da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Brasil.

Confronto direto entre patógeno e antagonista em cultura pareada (CP)

Para este teste, discos de ágar contendo micélio de *S. sclerotiorum* e do antagonista (5 mm Ø) foram retirados de colônias com três dias de cultivo e inseridos simultaneamente, em extremidades opostas das placas de Petri, contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram incubadas em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Após sete dias de cultivo, avaliou-se o crescimento micelial do patógeno e do antagonista, conforme escala proposta por Bell et al. (1982), modificada, como a seguir: Nota 1, *Trichoderma* spp. ocupando toda a superfície do meio (SM); Nota 1,5, *Trichoderma* spp. ocupando 7/8 da SM; Nota 2, *Trichoderma* spp. ocupando mais de 2/3 da SM; Nota 2,5, *Trichoderma* spp. ocupando 5/8 da SM; Nota 3, *Trichoderma* spp. e patógeno ocupando metade da SM; Nota 3,5, *Trichoderma* spp. ocupando 3/8 da SM; Nota 4, *Trichoderma* spp. ocupando 1/3 da SM, e Nota 5, ausência de crescimento de *Trichoderma* spp., com toda a SM ocupada pelo patógeno. Os valores relativos a cada nota foram transformados em porcentagem de colonização da placa de Petri pelo patógeno, antes das análises estatísticas.

Bioatividade de metabólitos voláteis (MV)

Após 24 horas de crescimento de *S. sclerotiorum* em BDA a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, bases de outras placas de Petri de tamanho correspondente, contendo meio BDA, receberam no seu centro um disco de ágar

Tabela 1. Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultivo pareado (CP) e efeito inibidor de metabólitos voláteis (MV), termolábeis (MTL) e não termolábeis (MNTL) produzidos por isolados *Trichoderma* sobre o desenvolvimento de colônias do patógeno.

Isolados de <i>Trichoderma</i> ⁴	Crescimento de colônias de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (%) sob o efeito de <i>Trichoderma</i> spp. ¹			
	CP ²	MV ³	MTL ³	MNTL ³
CEN571	16,5 a	91,0 d	64,7 d	1,2 a
CEN597	20,6 a	47,3 b	21,8 b	100,0 e
CEN654	24,7 b	17,1 a	9,5 a	0,3 a
CEN1193	25,0 b	88,0 d	36,7 c	2,7 a
50/02	25,2 b	90,1 d	78,1 e	100,0 e
CEN649	28,8 c	43,3 b	25,1 b	100,0 e
CEN1183	33,0 c	66,9 c	62,6 d	12,0 b
CEN555	33,0 c	9,5 a	25,1 b	5,0 a
CEN565	37,2 d	88,5 d	100,0 f	74,5 d
CEN623	37,2 d	85,7 d	22,3 b	0,3 a
CEN653	39,3 d	76,8 c	100,0 f	24,2 c
CEN639	41,5 d	100,0 d	91,5 f	17,2 b
CEN562	43,6 d	21,4 a	18,6 b	100,0 e
CEN572	47,8 e	72,5 c	100,0 f	80,2 d
48/02	50,0 f	83,4 d	47,0 c	100,0 e
CEN553	54,0 f	14,7 a	59,2 d	1,9 a
CV (%)	13,52	12,18	13,31	10,63

1. Valores seguidos pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

2. Percentual médio de colonização da superfície do meio BDA em placa de Petri.

3. Valores relativos à testemunha, obtidos de colônias de *S. sclerotiorum* aos 5 dias de crescimento.

4. O isolado CEN555 pertence à espécie *T. ganense* Doi, Abe & J. Sugiyama (1987). Os demais isolados são referidos como *Trichoderma* sp.

contendo micélio do antagonista. As bases das placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas, unidas com filme plástico transparente e incubadas em BOD de forma que as bases superiores foram as que continham o patógeno. Quando as testemunhas contendo apenas BDA encontraram-se totalmente colonizadas pelo patógeno (5 dias), tomaram-se as medidas de diâmetro das colônias de *S. sclerotiorum*. Os valores médios de percentagens de inibição pelos MV obtidos a partir de duas medições diametralmente opostas foram calculados em relação ao crescimento da testemunha. Assim, consideram-se 100% de crescimento as testemunhas cujas colônias ocuparam toda a superfície do meio (Carvalho *et al.* 2011a).

Bioatividade de metabólitos termo-lábeis (MTL)

Para a avaliação da estabilidade térmica dos metabólitos de *Trichoderma* spp., filtrados fúngicos dos antagonistas foram preparados a partir de cultivo em meio líquido Batata-Dextrose (BD). Para tanto, cinco discos (5 mm Ø) contendo micélio de *Trichoderma* spp. foram transferidos para frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 250 mL de meio BD. Após cinco dias de cultivo em agitador orbital (Labline Instruments, Inc., modelo 60160) a 250 rpm e temperatura de 25 ± 2 °C, em ausência de luz, alíquotas de 45 mL de filtrados das culturas foram autoclavadas a 120 °C durante 20 minutos e, então, incorporadas em 135 mL de meio BDA fundente antes da distribuição em placas de Petri. Após solidificação do meio, cada placa recebeu em seu centro um disco de ágar (5 mm Ø) contendo micélio retirado das bordas de culturas de *S. sclerotiorum* com seis dias de cultivo. As placas foram incubadas em BOD a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias, realizou-se a medida dos diâmetros das colônias. Os valores médios obtidos foram convertidos em porcentagem em relação ao crescimento médio da testemunha (placas sem a adição de metabólitos), que foi considerado como de 100% (Carvalho *et al.* 2011a).

Bioatividade de metabólitos não termo-lábeis (MNTL)

Para verificar a ação dos MNTL, filtrados das culturas de *Trichoderma* foram obtidos de cultivo em meio BD conforme o item anterior. Porém, ao invés de serem autoclavados, empregou-se o método de esterilização por filtração, com auxílio de bomba a vácuo. Cada isolado passou por três filtrações (filtro Millipore 0,45 µm), com 1, 2 e 3 papéis de filtro, respectivamente. Em seguida, cinco mililitros do filtrado de cada isolado foram adicionados ao meio BDA fundente, à razão de 25%. Após solidificação do meio, um disco de ágar (5 mm Ø) contendo micélio do patógeno foi depositado na superfície do meio, no centro da placa de Petri. As testemunhas foram preparadas mediante adição de água destilada esterilizada (ADE) ao BDA fundente. As culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, até completa colonização do meio pelo patógeno nas placas da testemunha. No quinto dia, as medidas dos diâmetros das colônias foram

quantificadas e os valores médios obtidos convertidos em porcentagem, em relação ao crescimento médio da testemunha, conforme item anterior.

Os experimentos com MV, MTL, MNTL e CP foram conduzidos duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada isolado de *Trichoderma* spp (Carvalho *et al.* 2011a).

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), com auxílio do programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira 2011). Além disso, realizou-se a análise de componentes principais (ACP) para avaliar as relações entre os ensaios e suas relações com os isolados, com auxílio do programa estatístico 'R' 2.15 (R Development Core Team, Vienna, Áustria).

RESULTADOS

Ao avaliar a taxa de crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em CP com *S. sclerotiorum*, constatou-se que dois isolados (CEN571 e CEN597) diferiram significativamente dos demais, permitindo que o patógeno colonizasse apenas 16,5 e 20,6% da superfície do meio, respectivamente (Tab. 1). Os demais isolados permitiram o crescimento do patógeno em índices variáveis entre 24,7 e 54,0% de colonização da placa. Já os resultados relativos à inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por MV produzidos por *Trichoderma* spp. apontaram quatro isolados (CEN562, CEN553, CEN654 e CEN555) como os melhores quanto à capacidade de inibir o crescimento micelial do patógeno, com valores médios em porcentagem de 21,4; 14,7; 17,1 e 9,5%, respectivamente (Tab. 1). Os demais isolados permitiram o crescimento do patógeno com valores médios entre 43,3 e 100% de colonização da placa.

Quanto à produção de MTL, novamente o isolado (CEN654) diferiu estatisticamente dos demais, permitindo apenas 9,5% de crescimento do patógeno em relação à testemunha (Tab. 1). Em seguida, houve diferenciação dos isolados CEN597, CEN649, CEN623, CEN555 e CEN562, os quais se mostraram superiores ao restante dos isolados, com valores de crescimento do patógeno de 21,8; 25,1; 22,3; 25,1 e 18,6%, respectivamente. Por último, apareceram os isolados que permitiram o crescimento do patógeno em índices de 36,7 a 100% de colonização do meio. Com relação aos MNTL, seis isolados se destacaram (CEN571, CEN654, CEN1193, CEN555, CEN623 e CEN553), com valores de crescimento do patógeno de 1,2; 0,3; 2,7; 5,0; 0,3 e 1,9%, respectivamente (Tab. 1). Os demais isolados permitiram o crescimento do patógeno em índices que variaram entre 12 e 100% de colonização do meio.

Baseando-se na análise de componentes principais (ACP), verificou-se que 69,37% da variância pode ser explicada pelas duas primeiras componentes (41,10% e 28,27%), como mostra a figura 1. Não houve correlação negativa entre os testes *in vitro* na ACP. O crescimento de

colônias de *S. sclerotiorum* (%) em cultura pareada (CP) com *Trichoderma* spp. foi positivamente correlacionado com o teste de metabólitos não termo-lábeis (MNTL). Similarmente, os testes de metabólitos voláteis (MV) correlacionaram-se positivamente com os testes de metabólitos termo-lábeis (MTL).

DISCUSSÃO

Neste trabalho, atenção foi dada ao percentual médio de colonização da superfície do meio BDA por *S. sclerotiorum* no teste de CP, em que os isolados CEN571 e CEN597 se destacaram (Tab. 1). O potencial de inibição do crescimento micelial do patógeno pode estar relacionado à competição por recursos disponíveis no substrato. Essa competição se traduz na eficiência dos isolados de *Trichoderma* spp. em mobilizar e assimilar imediatamente os nutrientes à sua volta, o que lhes confere maior rapidez na multiplicação e colonização dos sítios onde se encontram (Benítez *et al.* 2004). Segundo Carvalho *et al.* (2014), esse mecanismo contribui para a atividade antagonista, notadamente quando espaço e nutrientes são limitados e, talvez, seja este o principal mecanismo de ação antagonista desses fungos. Em conformidade com Carvalho *et al.* (2011a), verificou-se que 12,5% dos isolados apresentaram alto nível de antagonismo em CP, destacando-se estatisticamente dos demais, de modo que este é um número aceitável e previsível em

um programa de controle biológico de fitopatógenos (Louzada *et al.* 2009).

Acima do percentual encontrado em CP, 25% dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados produziram metabólitos voláteis tóxicos, os quais inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Tais resultados se justificam pela grande variabilidade existente entre isolados, mesmo dentro de uma mesma espécie, conforme preconizado por Martins-Corder & Melo (1998). Postula-se que os MV possuam vantagens sobre os MTL e MNTL, tais como a capacidade de difusão em interstícios, assim como na solução do solo, quando solúveis em água, enquanto os MTL e MNTL estão sujeitos à adsorção pelas partículas do solo e à biodegradação, antes que atinjam o alvo (Lobo Junior & Abreu 2000). Vale ressaltar a importância em se avaliar os MV, pois estes possuem aplicabilidade no controle de patógenos em sementes contaminadas, incluindo *S. sclerotiorum* (Carvalho *et al.* 2011a).

Com relação aos MTL, cabe ressaltar que a utilização de isolados que produzam tais metabólitos, capazes de manter sua bioatividade quando submetidos a temperaturas elevadas, torna-se vantajosa em solos arenosos onde a temperatura média pode passar de 30 °C. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que, embora tenha ocorrido um percentual médio no crescimento de colônias de *S. sclerotiorum*, comparando com os MV e MNTL, algum princípio ativo produzido pelo isolado

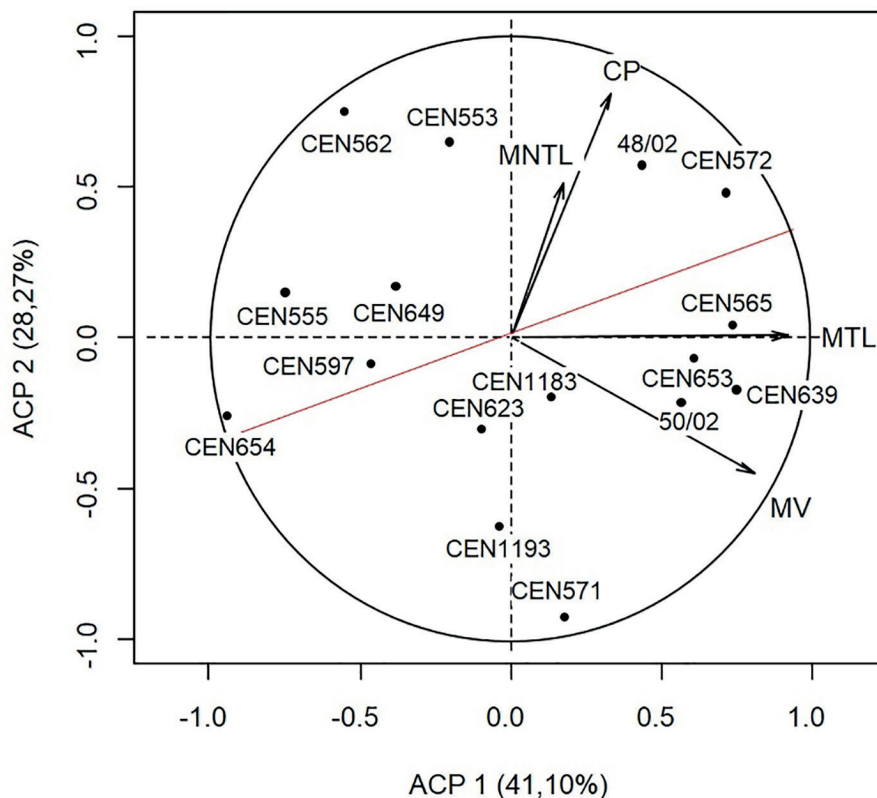


Figura 1. Análise de componentes principais (ACP) com os testes (CP, cultura pareada; MV, metabólitos voláteis; MTL, metabólitos termo-lábeis; MNTL, metabólitos não termo-lábeis) utilizados na seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. potencialmente úteis para o controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*, de acordo com as duas primeiras componentes principais.

CEN654 pode se manter bioativo, independentemente das condições ambientais de temperatura. A antibiose constitui uma importante interação antagonista e, tais metabólitos, após purificados, podem manter a mesma capacidade de biocontrole (Benítez *et al.* 2004). Esse fato abre perspectiva para o desenvolvimento de moléculas bioativas derivadas desses fungos. Conforme Vinale *et al.* (2008), a especificidade de um isolado para exercer antibiose ocorre mediante a produção de metabólitos pertencentes a uma variedade de classes de compostos químicos, que podem sugerir diferentes mecanismos de ação, e esta capacidade de produzir metabólitos tóxicos com efeito fungicida ou fungistático pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie.

De acordo com Dennis & Webster (1971), isolados com capacidade para produzirem substâncias não voláteis (MNLT) nem sempre produzem substâncias voláteis (MV). Isso explica as diferenças encontradas para os isolados CEN562, CEN571, CEN623 e CEN1193 quanto aos testes MV e MNLT. No entanto, os antagonistas CEN553, CEN555 e CEN654 utilizados no presente estudo foram produtores tanto de MV como de MNLT (Tab. 1). É reconhecida a importância de se conhecer os mecanismos de ação e selecionar isolados capazes de atuar por mais de um mecanismo, uma vez que esse fato confere vantagem ao agente de biocontrole quando liberado no ambiente. Ainda, deve-se levar em conta que a produção de metabólitos tóxicos com efeito fungicida ou fungistático ocorre de maneira associada com outros eventos atribuídos ao agente de biocontrole (Botelho *et al.* 2013).

A análise de componentes principais (ACP) visa reduzir um grande número de variáveis observadas para um número menor de fatores e a representação de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais, além de identificar a relação entre características extraídas de um número de dados (Hair Júnior *et al.* 2009). Assim, as duas primeiras componentes da análise multivariada forneceram informações suficientes para suportar os resultados evidenciados na ACP, mostrados na figura 1 (Geraldine *et al.* 2013). Dentre os potenciais isolados para controle biológico de *S. sclerotiorum*, quatro deles (CEN654, CEN571, CEN555 e CEN562) posicionaram-se opostamente no gráfico da ACP (Fig. 1). A combinação entre a produção de metabólitos (MV, MTL e MNLT) e o parasitismo (possível em CP) apresentado por alguns dos isolados de *Trichoderma* spp., comprovam a versatilidade da ação inibitória exercida contra os fitopatógenos (Ezziyyani *et al.* 2007). Com base nisso, especialmente o isolado CEN654, foi o melhor em três dos quatro testes *in vitro*, sendo considerado o melhor isolado dentre os 16 testados. Sendo assim, traçou-se um eixo (evidenciado em vermelho no gráfico da ACP) a partir do isolado CEN654, o que permitiu verificar que este eixo passou entre as setas dos testes CP e MTL, no gráfico da ACP.

Os dados da figura 1 mostram que os quatro testes *in vitro* permitem selecionar o isolado mais versátil, onde

verificou-se que o teste com MNLT, cuja seta mais curta (Fig. 1), indica sua menor contribuição para a ACP quando comparada aos outros testes, a exemplo do teste com MV, que se posicionou mais à margem em relação ao eixo traçado a partir do isolado CEN654 (eixo em vermelho). Evidenciou-se que os testes CP e MTL estão mais próximos ao eixo traçado a partir do isolado CEN654 e, conseqüentemente, mais relacionados com a seleção *in vitro* de um isolado antagonista a *S. sclerotiorum* mais completo, do que as outras duas variáveis (MNLT e MV). Resumidamente, a combinação entre antibiose (MV, MTL e MNLT) e a rápida capacidade em colonizar espaço (CP) parecem ser responsáveis pelo desempenho diferenciado do isolado CEN654, comparado aos outros isolados (Tab. 1). Com base nisso, o isolado CEN654 foi posicionado separadamente dentro do gráfico da ACP (Fig. 1). Isolados que se mostraram ineficientes ou de moderada eficiência nos testes realizados, deverão ser mantidos em condições seguras, para uso futuro em estudos visando ao biocontrole de outros patógenos, bem como para prospecção da produção de enzimas e outros metabólitos de interesse agroindustrial.

CONCLUSÕES

Após realização de quatro testes *in vitro* (CP, MV, MTL e MNLT) contra *S. sclerotiorum*, o isolado CEN654 é um exemplo de versatilidade disponível em *Trichoderma* spp.

Com base na ACP, os testes de CP e MTL estão mais relacionados à seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. mais versáteis do que os testes com MV e MNLT.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) por uma bolsa de produtividade em pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, F. R. & GONZAGA, A. C. O. 2012. *Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão (Documentos), 247 p.
- BELL, D.K., WELLS, H.D. & MARKHAM, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382.
- BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C. & CODÓN, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- BOTELHO, L.S., ZANCAN, W.L.A., MACHADO, J.C. & BARROCAS, E.N. 2013. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Seed Science*, 35: 153-160.
- CARNEIRO, F.F., SANTOS, J.B., GONÇALVES, P.R.C., ANTONIO, R.P. & SOUZA, T.P. 2011. Genetics of common bean resistance to white mold. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11: 165-173.
- CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JUNIOR, M. & GERALDINE, A.M. 2011a. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 822-828.
- CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JUNIOR, M. & SILVA,

- M.C. 2011b. 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*, 36: 28-34.
- CARVALHO, D.D.C., LOBO JUNIOR, M., MARTINS, I., INGLIS, P.W. & MELLO, S.C.M. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, 39: 384-391.
- CASTILLO, F. D. H., PADILLA, A. M. B., MORALES, G. G., SILLER, M. C., HERRERA, R. R., GONZALES, C. N. A. & REYES, F. C. 2011. In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6: 410-417.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society*, 57: 363-369.
- EZZIYYANI, M., REQUNENA, M.E., EGEE-GILABERT, C. & CANDEL, M.E. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology*, 155: 342-349.
- FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042.
- 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. 2013. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 67: 308-316.
- HAIR JUNIOR, J.F., BLACK, W.C., BABIN, B.J., ANDERSON, R.E. & TATHAM, R.L. 2009. *Análise multivariada de dados*. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 688p.
- LOBO JÚNIOR, M. & ABREU, M.S. 2000. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. *Ciência e Agrotecnologia*, 24: 521-526.
- LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I. & BRAÚNA, L.M. 2009. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. *Biota Neotropica*, 9: 145-149.
- MARTINS-CORDER, M.P. & MELO, I.S. 1998. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia Agrícola*, 55: 1-7.
- MELLO, S.M.C., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R. & GOMES, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11: 1-11.
- MORANDI, M.A.B. & BETTIOL, W. 2009. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W. & MORANDI, M.A.B. (Eds). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.07-14.
- PAULA JÚNIOR, T.J., TEIXEIRA, H., VIEIRA, R.F., MORANDI, M.A.B., LEHNER, M.S., LIMA, R.C. & CARNEIRO, J.E.S. 2012. Limitations in controlling white mold on common beans with *Trichoderma* spp. at the fall-winter season. *Summa Phytopathologica*, 38: 337-340.
- REINO, J.L., GUERRERO, R.F., HERNÁNDEZ-GALÁN, R. & COLLADO, I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7: 89-123.
- VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., MARRA, R., WOO, S.L. & LORITO, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1-10.