

Biocontrole de *Phytophthora* sp. por isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*

Biocontrol of Phytophthora sp. by isolates of Trichoderma spp. in vitro

MATOS, Dilânia Lopes¹; ALVES, Crislei Ferreira¹; FELITO, Ricardo Adriano¹; DAVID, Grace Queiroz¹; PERES, Walmor Moya¹.

¹Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT, dilan_lopes@hotmail.com, crisleialves@outlook.com, ricardofelito@hotmail.com, gracequeirozdavid@hotmail.com, walmorperes@unemat.br.

Resumo: O uso do controle biológico se caracteriza como uma estratégia promissora no manejo de doenças de plantas. Entre os principais agentes utilizados no biocontrole estão espécies do gênero *Trichoderma*. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial do fungo *Phytophthora* sp. O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 10 repetições. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados quanto ao potencial antagônico contra *Phytophthora* sp. por meio do pareamento de culturas e atribuição de notas por meio da aplicação de duas escalas. As variáveis analisadas foram crescimento médio micelial (CMM), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), percentual de inibição de crescimento (PIC) e médias de notas atribuídas ao cultivo pareado de isolados de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora* sp. seguindo as escalas de Bell e Rodrigues. As médias obtidas foram submetidas a análise de variância, seguido de teste de comparação de médias. Foi verificado efeito significativo sobre o fitopatógeno por isolados de *Trichoderma* spp. para todas as variáveis testadas que diferiram significativamente em relação à testemunha. Houve redução do crescimento micelial e índice de velocidade de crescimento de *Phytophthora* sp., os percentuais de inibição de crescimento se mantiveram acima de 70% e as notas atribuídas indicaram atividade antagônica eficiente. Assim, os resultados demonstraram que houve efeito promissor dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp. *in vitro*.

Palavras-chave: controle biológico, antagonismo, crescimento micelial.

Abstract: The use of biological control is characterized as a promising strategy for the control of plant pathogens. *Trichoderma* species are among the main agents used for biocontrol and are widely used in agriculture. The aim of this study was to evaluate the antagonistic effect of *Trichoderma* spp. on the mycelial growth of *Phytophthora* sp. The test was conducted in the Laboratory of Microbiology and Plant Pathology of the State University of Mato Grosso, in a completely randomized design with 5 treatments and 10 repetitions. The *Trichoderma* spp isolates were evaluated for their antagonistic potential against the plant pathogen *Phytophthora* sp. through the pairing of cultures and application of two scales of notes. The variables analyzed were mycelial growth medium (CMM), mycelial growth rate index (IVCM), growth inhibition percentage (PIC) and average scores to the paired cultivation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora* sp. The means were subjected to analysis of variance, followed by mean comparison test. It was found significant effect on the pathogen

by *Trichoderma* spp. for all tested variables and significant difference compared to the control. There was a reduction of mycelial growth of *Phytophthora* sp., Percentage growth inhibition above 70% and the marks awarded indicated effective antagonistic activity. Thus, the results showed promising effect of *Trichoderma* spp. on the mycelial growth of *Phytophthora* sp. in vitro.

Keywords: biocontrol, antagonism, mycelial growth.

Introdução

Nos últimos anos, tem-se verificado uma crescente preocupação por parte da população, com os problemas ambientais oriundos das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura. Essa preocupação vem resultando na busca por tecnologias de produção rentáveis, socialmente justas e com um enfoque ecológico (SILVA; MELLO, 2007). Há uma demanda por métodos alternativos que garantam a rentabilidade da atividade do produtor e que colaborem para a diminuição do uso de produtos químicos que podem causar riscos à saúde humana e ambiental (BONETT et al., 2013).

O uso do controle biológico se caracteriza como uma estratégia promissora no manejo de fitopatógenos. Morandi et al. (2005), afirmam que a adoção do controle biológico e de outros métodos alternativos na agricultura no manejo dos problemas fitossanitários, colaboram para a racionalização do uso de agrotóxicos e atendem às exigências de uma produção de alimentos saudáveis e com qualidade ambiental.

Segundo Fortes et al. (2007) espécies do gênero *Trichoderma* são amplamente utilizadas na agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças. *Trichoderma* encontra-se entre os principais agentes utilizados para biocontrole, cuja capacidade antagonista foi descoberta há mais de 50 anos (WEIDLING, 1934). Podem atuar, via de regra, por meio de um ou da associação dos seguintes mecanismos: parasitismo, antibiose, competição (MELO, 1998) e indução de resistência (LUCON, 2009).

Dentre os agentes causais de doenças em plantas de importância econômica, encontra-se espécies do gênero *Phytophthora*. De acordo com Silva et al. (2008), considerando os custos financeiros e ambientais dos produtos químicos utilizados para controle de *Phytophthora*, e com as crescentes restrições à presença de resíduos no solo, o uso do controle biológico é considerado uma alternativa importante e tecnicamente justificável.

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp. in vitro.

Metodologia

O estudo foi realizado em 2016 no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT, Campus de Alta Floresta. Foram testados quanto ao potencial antagônico contra o fungo *Phytophthora* sp. isolados de *Trichoderma* spp., provenientes de solo das culturas de quiabo (TC133), pimentão (TC103) e cacau (TC105), e um comercial a base de *Trichoderma asperellum* (PC07). Os isolados de *Trichoderma* e de *Phytophthora* sp. pertencem à Micoteca do Laboratório de Microbiologia da UNEMAT.

Os tratamentos consistiram de 4 isolados de *Trichoderma* spp., mais testemunha sem adição de antagonista, com 10 repetições cada, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados quanto ao potencial antagônico contra o fitopatógeno *Phytophthora* sp. por meio do pareamento de culturas (confronto direto) descrita por Dennis e Webster (1971), metodologia na qual, discos de Ø10 mm, contendo micélios do patógeno e antagonista são depositados em lados opostos em placas de Petri (Ø 90 mm) a distância de 0,5 cm da borda. O crescimento micelial foi estimado em meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA). As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura aproximada de 27 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas através de medições diárias do diâmetro das colônias do fitopatógeno, com auxílio de uma régua milimetrada. A avaliação foi finalizada quando foi verificado que não houve mais crescimento micelial da colônia.

As variáveis estimadas foram: crescimento médio micelial (CMM), obtido das medidas diárias do crescimento em diâmetro (mm) da colônia do patógeno; índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) expresso em mm dia⁻¹, obtido a partir das médias dos valores diários de crescimento micelial de cada tratamento, conforme proposto por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\sum(D - D_a)}{N}$$

Em que,

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação

Foi verificada a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos tratamentos em relação a testemunha, obtida por meio da fórmula de Abbott, (1925):

$$\text{PIC} = \left\{ \frac{(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento})}{\text{diâmetro da testemunha}} \right\} \times 100.$$

A capacidade antagônica dos isolados de *Trichoderma* spp. também foi avaliada por meio da atribuição de notas aos sete e 14 dias após incubação. Foi adotado duas escalas de notas (Figuras 1 e 2). a) Escala de notas de Bell et al. (1982), notas que variam de 1 a 5, onde: 1 – Antagonista cresce e ocupa toda placa de Petri; 2 – Antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 3 – Antagonista e patógeno crescem até metade da placa; 4 – Patógeno cresce sobre 2/3 da placa; 5 – Patógeno cresce por toda placa. De acordo com Louzada et al. (2009), nota menor ou igual a 3,0, o isolado pode ser considerado como antagônico ou eficiente. b) Escala de notas de Rodrigues (2010), onde as placas são sobrepostas em um croqui e, atribui-se notas variando de 1 a 7. Nesse caso nota 7 expressa o máximo potencial antagônico, indicando que houve desenvolvimento do antagonista sobre a colônia do fitopatógeno.

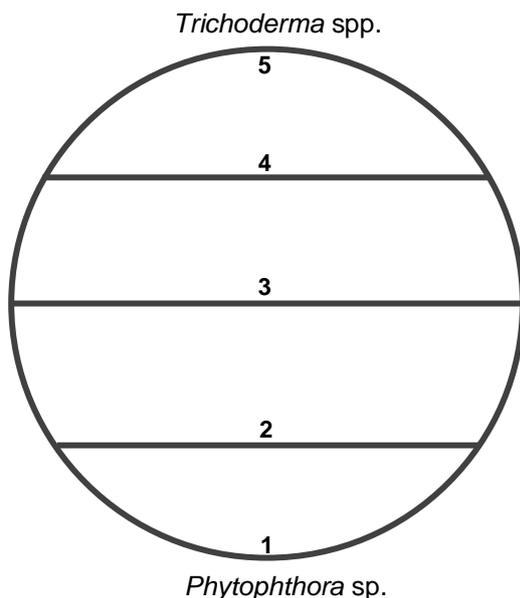


Figura 1: Escala de Bell, 1892.

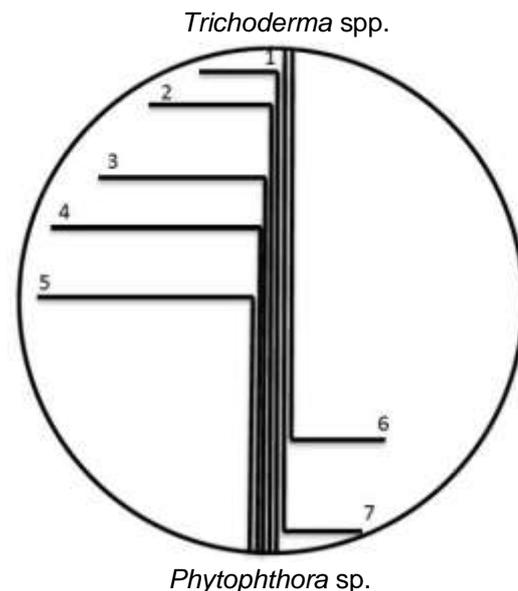


Figura 2: Escala de Rodrigues, 2010.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, seguido de teste de comparação de médias (Tukey) ao nível de significância de 5%, com uso do software Sisvar® (FERREIRA, 2011).

Resultados e discussão

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial do patógeno *Phytophthora* sp. e apresentaram comportamento semelhante em todas as variáveis estudadas. Verificou-se que os diâmetros médios das colônias do fitopatógeno, após pareamento das culturas, diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 1). Silva et al. (2008), também encontraram efeito significativo na inibição do crescimento micelial de *Phytophthora citrophthora*, utilizando diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram rápido crescimento micelial. Comportamento similar foi observado por Bomfim (2010), avaliando atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer*, relatou que a liberação de metabólitos pelos antagonistas, poderia ser a causa da redução do crescimento da colônia do fitopatógeno na presença de *Trichoderma* spp.

Tabela 1. Crescimento médio micelial de *Phytophthora* sp. na presença de isolados de *Trichoderma* spp. Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, Alta Floresta-MT, 2016.

TratamentosCrescimento Médio Micelial (mm)	
	7º Dia	IVCM
T ₁ - <i>Phytophthora</i> sp. x TC133	⁽¹⁾ 15,00 a	3,34 a
T ₂ - <i>Phytophthora</i> sp. x PC07	15,21 a	3,55 a
T ₃ - <i>Phytophthora</i> sp.x TC103	17,04 ab	4,38 ab
T ₄ - <i>Phytophthora</i> sp.x TC105	19,84 b	5,44 b
T ₅ - <i>Phytophthora</i> sp.	45,77 c	14,24 c
C.V. (%)	5,95	9,85

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ⁽¹⁾ Diâmetro médio da colônia de *Phytophthora* sp. (mm).

O pareamento das culturas ocorreu a partir do 3º dia após incubação. O menor crescimento médio micelial do fitopatógeno ao 7º dia foi verificado na presença do isolado TC133, corroborando com o menor valor verificado para o IVCM. Os demais tratamentos também apresentaram efeito promissor e diferiram significativamente em relação à testemunha, indicando inibição do crescimento do fitopatógeno na presença dos antagonistas.

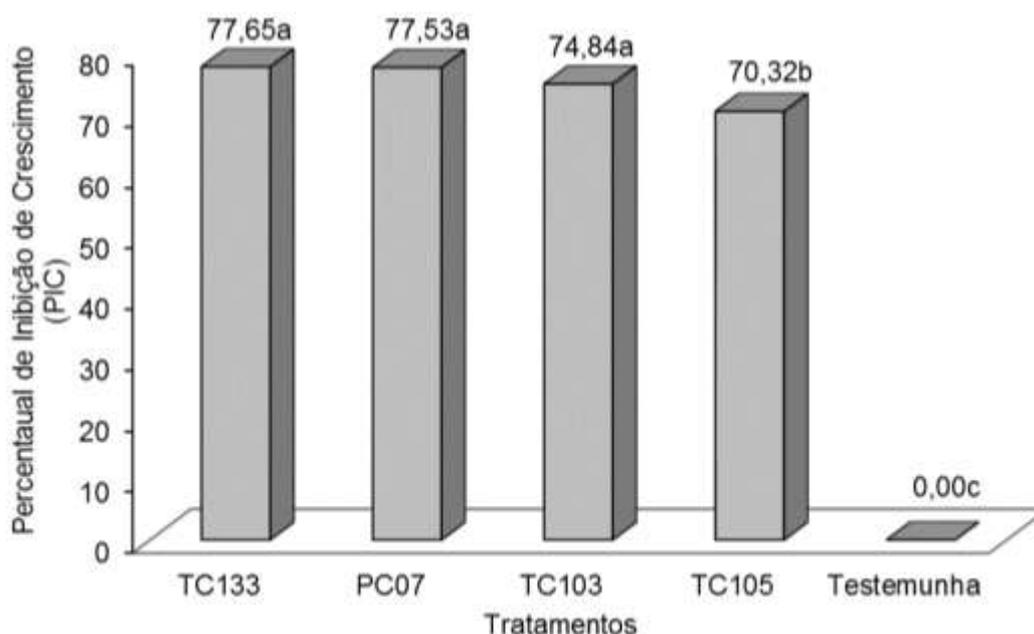
Foi relatado que o nível de controle de um fitopatógeno pode variar com o isolado do antagonista utilizado e com sua capacidade de adaptabilidade às condições bióticas e abióticas específicas (DENNIS; WEBSTER, 1971) dentro e entre espécies de *Trichoderma* (CARVALHO FILHO et al., 2008).

Segundo Marchetti et al. (1992), as espécies de *Trichoderma* são geralmente consideradas competidoras agressivas, apresentando rápido crescimento e

colonização, excluindo muitos fitopatógenos. Infere ainda, que a eficiência da inibição do crescimento do fitopatógeno pelo *Trichoderma* pode também estar relacionada a altas taxas e acumulação de CO₂ por parte do antagonista.

Para a variável PIC, foi verificado valores superiores à 70% de inibição de crescimento do fitopatógeno na presença dos isolados de *Trichoderma* spp. Confirmando o observado para o CMM e IVCM, o maior percentual de inibição de crescimento foi apresentado pelo isolado TC133 (Figura 3). Os demais tratamentos também apresentaram potencial de inibição e diferiram significativamente da testemunha.

Figura 3. Percentual de inibição de crescimento atribuído ao cultivo pareado de *Phytophthora* sp. com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. avaliados aos 10 dias após inoculação.



*Médias seguidas pela mesma letra por variável não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C. V. (%) 2,97. Alta Floresta-MT, 2016.

De acordo com Denis e Webster (1971) o antagonismo de *Trichoderma* spp., deve-se a produção de antibióticos, de amplo espectro, como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina e dermadina, que têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos. Além de antibióticos, *Trichoderma* spp. produzem enzimas, como celulase e hemicelulase, capazes de degradar materiais lignocelulolíticos e causar lise na parede de células de fungos patogênicos (VEY; HOAGALND; BUTT, 2001).

Bell et al. (1982), salientam que a capacidade de produção de antibióticos pelos antagonistas, podem interferir no desenvolvimento do fitopatógeno, bem como a

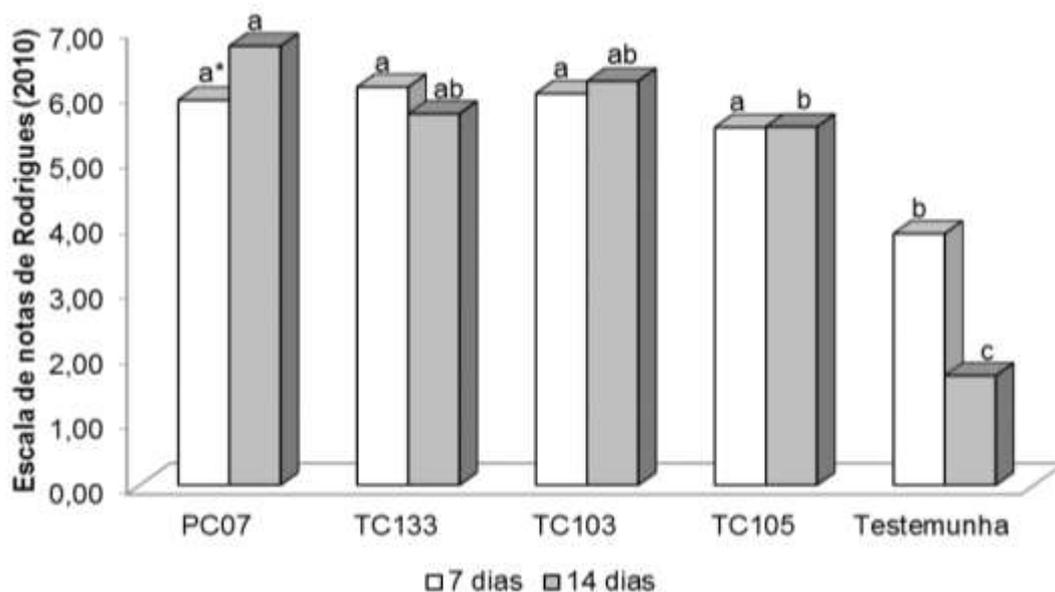
competição destes por espaço e nutrientes. Foi verificado, neste trabalho, ativo crescimento micelial e esporulação de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora* sp., demonstrando alta capacidade competitiva (Figura 4).



Figura 4. Placas de Petri com diferentes níveis de interação, entre isolados de *Trichoderma* spp. e o isolado de *Phytophthora* sp. em teste de pareamento de culturas.

As notas atribuídas segundo escala de Rodrigues (2010), apresentaram médias entre 5,5 a 7,8 aos 14 dias após incubação, indicando que houve sobreposição das colônias do fitopatígeno pelo antagonista (Figura 5).

Figura 5. Médias de notas atribuídas ao cultivo pareado de isolados de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora* sp. aos 7 e 14 dias após inoculação, utilizando a escala de Rodrigues (2010). Alta Floresta-MT, 2016.



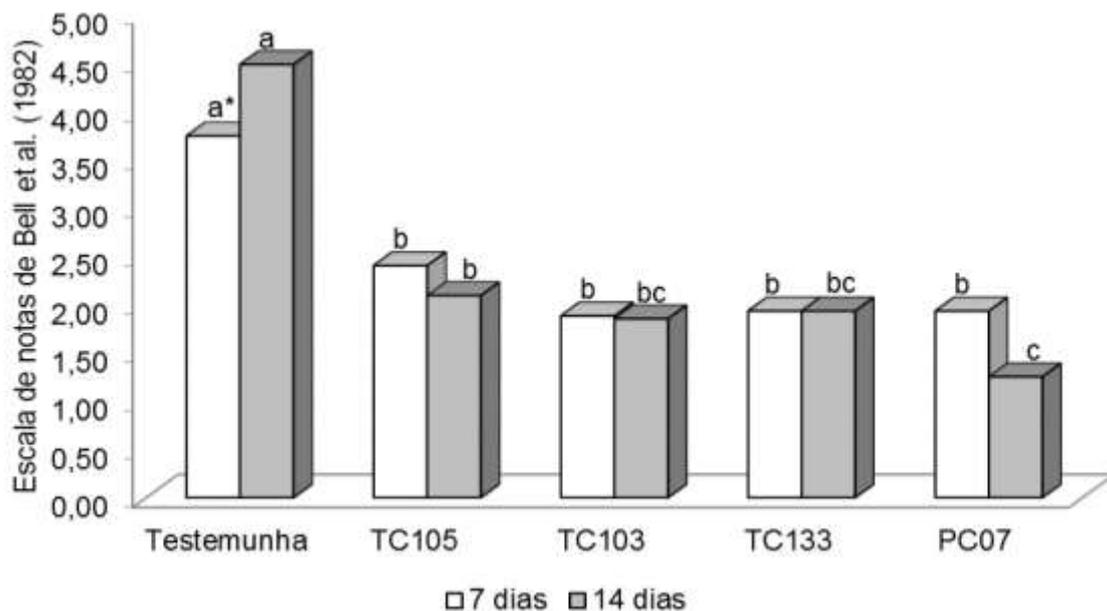
*Médias seguidas pela mesma letra minúscula por variável não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C.V. (%) 7 dias = 8,35 e 14 dias = 11,02.

Vey et al. (2001), explicam que a inibição do crescimento do fitopatígeno ocorre devido ao antagonista apresentar um crescimento rápido até sobre o patógeno, sendo uma característica vantajosa na colonização, vencendo o patógeno na

competição por espaço ou por nutrientes. Hanada et al. (2009), em teste com o isolado de *Trichoderma martiale* para o controle de *Phytophthora palmivora* em frutos de cacaueiro, verificaram grande potencial como agente de controle biológico do patógeno pelo antagonista.

Tendo como base a escala de Bell (1982), com notas variando entre um (colonização de toda a superfície da placa pelo antagonista) a cinco (colonização de toda a superfície da placa pelo fitopatógeno) sobre o fungo. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram notas entre 1,25 a 2,09. Com isso, foram considerados eficientes (Figura 6).

Figura 6. Médias de notas atribuídas ao cultivo pareado de isolados de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora* sp. aos 7 e aos 14 dias após inoculação, utilizando a escala de Bell et al. (1982). Alta Floresta-MT, 2016.



*Médias seguidas pela mesma letra minúscula por variável não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C.V. (%) 7 dias = 19,94 e 14 dias = 15,00.

Foi possível verificar que os resultados das duas escalas coincidiram quanto à indicação da capacidade antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp., podendo ser utilizadas em teste de confronto direto contra isolado de *Phytophthora* sp. Moraes e Carvalho (2014), avaliando antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. contra *Sclerotinia Sclerotiorum*, verificaram que essas duas metodologias podem ser utilizadas para avaliação do antagonismo entre microrganismo.

Os resultados demonstraram que houve efeito promissor dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp. em condições *in vitro*. As escalas de notas de Bell (1982) e de Rodrigues e (2010)



indicaram que houve crescimento e sobreposição de colônias do fitopatógeno por isolados de *Trichoderma* spp.

Conclusões

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados apresentaram efeito promissor sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *in vitro*, caracterizando-se como uma alternativa potencial ao manejo sustentável de *Phytophthora* sp. em testes a campo.

Referências bibliográficas

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p.265-267, 1925.

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.

BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N. O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.

BONETT, L.P.; HURMANN, E.M.S.; POZZA JÚNIOR, M.C.; ROSA, T.B.; SOARES, J.L. Biocontrole *in vitro* de *Colletotrichum musae* por Isolados de *Trichoderma* spp. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 5-10, 2013.

CARVALHO FILHO, M. R.; MENEZES, J. E.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle de mancha foliar do eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2008. 21p.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Brist. Mycol. Soc.*, v.57, p.25-39, 1971a.

FERREIRA D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 1039-1042, 2011.

FORTES, F.O.; SILVA, A.C.F.; ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.



HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; SOBERANIS, W.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. Biocontrol potencial of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biological Control**, v. 50, p. 143-149, 2009.

LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I.; BRAUNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotrop**, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

LUCON, C. M. M.; KOIKEI, C. M.; ISHIKAWAI, A. I.; PATRÍCIO, F. R. A.; HARAKAVAI, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 225-232, 2009. 7

MARCHETTI, R., NIPOTI, P., D'ERCOLE, N. & GUERZONI, M.E. Competition at atmosphere level as biocontrol mechanism in *Trichoderma* spp. **Petria**, 2: 137-47, 1992.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

MORAES, G. M.; CARVALHO 1 L. R. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* sp. contra *Sclerotinia Sclerotiorum*. **Revista Faculdade Montes Belos (FMB)**, v. 8, nº 5, 2015, p (99-139), 2014.

MORANDI, M. A.B.; BETTIOL, W.; GHINI, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Venzon, M.; Paula Jr. T. J.; Pallini, A. Controle alternativo de Pragas e Doenças. Viçosa. Epamig/CTZM: UFV. 2005. pp. 247-268.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1999.

RODRIGUES, J. ***Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum***. 2010. 84 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2007. 17 p.



SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, D. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma spp.* ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina**: Ciências Agrárias, Londrina – PR, v. 29, n. 4, p.749-754, 2008.

VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.N. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Bristol: **CAB International**, 2001, p.311-46.

VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.N. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Bristol: CAB International, 2001. p.311-46.

WEINDLING, R. Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytop.**, v.24, n.1, p.1153-1179, 1934.