II Congresso Internacional das Ciências Agrárias COINTER - PDVAgro 2017

POTENCIAL DE ANTAGONISMO DE ISOLADOS DE *Trichoderma asperellum* CONTRA *Rhizoctonia Solani* *in vitro*

Apresentação: Comunicação Oral

Cássia Cristina Chaves Pinheiro¹; Aline Figueiredo Cardoso²; Waldiney Xavier Ferreira³; Gisele Barata da Silva⁴.

Resumo

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça mais consumida no Brasil e uma das principais doenças que incidem a cultura é causada pelo agente etiológico *Rhizoctonia solani*, patógeno de solo responsável por perdas elevadas de produtividade. Como alternativa de biocontrole, um método que pode ser empregado contra patógenos de solo é o uso de microrganismos, sendo o gênero *Trichoderma* um dos mais utilizados por exercer antagonismo a vários fitopatógenos através do parasitismo e/ou antibiose. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antagônico de quatro isolados de *Trichoderma asperellum* sobre *R. solani* isolado da alface. Foi utilizado o método de pareamento direto de colônias, quando discos de cultura do patógeno e dos antagonistas cultivados por sete dias em BDA, foram pareados de forma equidistante em placas de Petri ($\varnothing = 08$ cm) contendo o mesmo meio de cultura, em pólos opostos das placas, a 5 mm de distância da borda, e incubados em temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12h claro/escuro por três dias. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com quatro repetições, utilizando-se quatro isolados de *T. asperellum* (T06, T09, T12 e T52) e o tratamento controle. O experimento foi avaliado medindo-se o crescimento radial das colônias do patógeno na presença de cada antagonista, calculando-se o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e o Percentual de Inibição do Crescimento Radial (PICR) médio. A análise estatística de variância foi feita pelo teste F ($p\text{-valor} \leq 0.05$) e as médias de crescimento foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p\text{-valor} \leq 0.05$). O programa utilizado para as análises foi o SISVAR, versão 5.6. Observou-se diferença estatística significativa no IVCM e PICR entre os tratamentos de *R. solani* pareados com *Trichoderma* sp. e o tratamento controle. O isolado T09 provocou o menor IVCM com 3,64 cm e o PICR com 45, 42%, apresentando-se desta forma, com agente de biocontrole potencial no crescimento micelial *in vitro* de *R. solani*.

Palavras-Chave: Biocontrole, Inibição, Tombamento.

¹ Acadêmica de Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, Brasil, cassiapinheiro002@gmail.com;

² Agrônoma e Doutoranda em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, Brasil, aline_f_cardoso@hotmail.com;

³ Acadêmico de Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, Brasil, ney_wxf@hotmail.com

⁴ Dra, Professora na Área de Microbiologia da Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, Brasil,

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família Asteraceae sendo a hortaliça folhosa de maior consumo no Brasil e a mais cultivada no mundo (SALA; COSTA, 2012). É considerada uma fonte de vitaminas e sais minerais, destacando-se seu elevado teor de vitamina A, além de conter vitaminas B1 e B2, vitaminas C, cálcio e ferro (FERNANDES *et al.*, 2002). Entretanto, o seu cultivo apresenta limitações, principalmente em virtude de sua sensibilidade às condições adversas de temperatura e umidade (GOMES *et al.*, 2005) que podem ser fatores cruciais para o surgimento de doenças fúngicas. As doenças ocasionadas por patógenos habitantes do solo são as mais limitantes para o cultivo de alface, pois além de inutilizarem comercialmente toda a planta, comprometem a área para plantios posteriores (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 1998).

Entre os principais patógenos radiculares que causam grandes prejuízos para a cultura no Brasil (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 1998; PAVAN; KURAZAWA, 1997; TEIXEIRA-YAÑEZ *et al.*, 2003), destaca-se o fungo *Rhizoctonia solani* (FENILLE; SOUZA, 1999; BERGAMIM FILHO, 1995; CARVALHO; TOKESHI, 1980; MESSIAEN; LAFON, 1976), agente etiológico da doença Damping-off também conhecida como tombamento. Esse fungo, geralmente, é encontrado na forma micelial, pois não produz esporos e utiliza como forma de sobrevivência no solo a formação de estruturas globulosas denominadas escleródios ou esclerócios (KRUGNER *et al.*, 1995) que podem sobreviver no solo por, no mínimo, um ano (PÁDUA *et al.*, 2007). Segundo Bedendo (1995), damping-off é um grupo de doença que incide em tecidos vegetais jovens, em sementes recém plantadas que apodrecem, devido à ação de patógenos presentes no solo ou veiculados na semente, ocorrendo antes da germinação e após o entumescimento deste órgão, reduzindo o “stand” inicial de plantas no viveiro de produção de mudas ou no campo, sendo popularmente chamado de tombamento.

Em busca de um desenvolvimento agrícola sustentável, cada vez mais o agricultor familiar distancia-se dos insumos sintéticos e passa a fazer uso de insumos orgânicos, que tem demandado da pesquisa informações e indicadores de fertilidade, controle de pragas e doenças cada vez mais preciso (ALENCAR *et al.*, 2012). Microrganismos antagonistas quando empregados como alternativa ao controle químico podem proporcionar excelentes níveis de controle a médio e longo prazo (KIM *et al.*, 2008). Entre esses microrganismos, os fungos do gênero *Thichoderma* são considerados eficientes antagonistas contra uma série de fungos fitopatogênicos, atuando tanto pela produção de metabólitos voláteis como de não voláteis (CLAYDON *et al.*, 1987; CAMPOROTA, 1985; RAI *et al.*, 1980; DENNIS & WEBSTER, 1971) como também pelo hiperparasitismo (PAPAVIZAS, 1985; BARAK *et al.*, 1985; VAJNA, 1985; CHET; ELAD, 1983; DENNIS & WEBSTER, 1971; BARNETT, 1963) e pela competição por nutrientes, espaço e oxigênio (CHET;

ELAD, 1983). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antagonista in vitro de 5 isolados de *Trichoderma* sp. contra *R. solani* isolado da alface, visando futuros trabalhos no biocontrole da doença.

Fundamentação Teórica

Doenças de plantas desempenham papel significativo em prejuízos na agricultura. E os fungos são responsáveis por perdas em todos os tipos de cultivos agrícolas. Além disso, não só as lavouras, mas produtos pós-colheita também sofrem com infecções fúngicas. Compostos químicos têm sido usados há mais de 70 anos para controlar doenças de plantas, mas o uso desenfreado tem promovido diversos problemas socioambientais. (BETTIOL; MORANDI, 2009).

E em virtude de dificuldades com a falta de resistência varietal da alface a *R. solani* (LI; HUANG; ACHARYA, 2003), resistência a fungicidas por populações de patógeno, acúmulo de resíduos deixados por agroquímicos no meio ambiente e com o avanço do sistema de produção orgânica, há interesse na busca de práticas de controle alternativo (VIEIRA *et al.*, 2001).

Uma das alternativas ao controle químico é o controle biológico, que além de apresentar especificidade ao alvo, utiliza diferentes meios para atingi-lo, restringindo as chances de selecionar linhagens resistentes. Em contrapartida, não contamina os alimentos e nem o meio ambiente, participando naturalmente da ciclagem dos nutrientes. Dentro desse contexto, o uso de microrganismos que antagonizam patógenos de plantas é uma saída sustentável para a problemática de controle de doenças na agricultura, principalmente na área de horticultura, onde os cultivares, por serem de ciclo curto, podem adquirir mais agrotóxicos, pois não possuem um tempo de carência alto.

Segundo Monte (2001), 90% das aplicações de microrganismos antagonistas na agricultura são com os isolados de espécies *Trichoderma*, fungos filamentosos de vida livre comuns no solo e em ecossistemas radiculares e facilmente isolados. Apresentam rápido crescimento em micro cultura com abundante produção de esporos (HOWEEL, 2003).

Metodologia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA, campi de Belém, Pará.

Os isolados de *T. asperellum* se encontram depositados na coleção de microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas. Foram selecionados para os testes quatro isolados que apresentaram melhor desempenho em testes preliminares de antagonismo *in vitro* e *in vivo* contra

outros fitopatógenos e também em testes de promoção de crescimento em plantas.

Obtenção do isolado de *Rizoctonia solani* da alface

O patógeno foi isolado de folhas com sintomas de mela em uma horta experimental localizada na UFRA, em Belém, PA. O material com sintomas da doença foi levado ao Laboratório de Proteção de Plantas para isolamento indireto do fungo, segundo Alfenas et al. (2007). As placas foram dispostas em uma bancada, à temperatura ambiente, até que se observasse o crescimento micelial das colônias. Para a identificação dos fungos, foram feitas lâminas microscópicas para a observação das características das colônias e estruturas dos fungos, objetivando a identificação da espécie, por comparação com a literatura pertinente (BARNET; HUNTER, 1972).

Antagonismo in vitro de *T. asperellum* contra *R. solani*

O antagonismo de *T. asperellum* a *R. solani* foi avaliado pelo método de pareamento de colônias, sendo que as culturas do patógeno e dos antagonistas foram reativadas em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) sete dias antes da instalação do experimento. Os discos de cultura do patógeno e dos antagonistas ($\varnothing = 5$ mm) foram colocados em lados opostos e equidistantes de placas de Petri (5mm de distância da borda) contendo BDA, as quais foram dispostas em uma bancada, à temperatura ambiente com fotoperíodo de 12h claro/escuro.

A avaliação foi iniciada a partir de 24 horas da instalação do experimento, medindo-se diariamente o crescimento radial (cm) das colônias, até o crescimento completo da testemunha na placa. Os dados obtidos com essa avaliação foram empregados no cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), segundo equação adaptada de Oliveira (1991), calculado pela seguinte fórmula: $IVCM = \frac{D - D_a}{N}$, em que D é igual ao diâmetro atual da colônia, D_a é o diâmetro do dia anterior e N é o número de dias após o início do experimento.

Foi determinada a percentagem de inibição do crescimento radial do patógeno nos tratamentos, em relação à testemunha, de acordo com a equação de Ezziyyani et al. (2004), calculado pela seguinte fórmula: $PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1}$, sendo PICR= % de inibição de crescimento micelial, R_1 =Raio da testemunha e R_2 = Raio do tratamento.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos, constituído de quatro isolados de antagonistas (T06, T09, T12 e T52) e do tratamento controle, em quatro repetições. Os resultados obtidos apresentaram distribuição normal e foram submetidos à Análise de Variância, aplicando-se o teste F ($p\text{-valor} \leq 0.05$). As médias de IVCM e PICR foram comparadas pelo teste de Scott- Knott ($p\text{-valor} \leq 0.05$), utilizando-se o programa SISVAR, versão 5.6

(FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

Observou-se que todos os isolados testados de *T. asperellum* (T06, T09, T12 e T52) demonstraram efeito antagônico significativo sobre o crescimento micelial de *R. solani*, quando comparados com ao tratamento controle, destacando-se o isolado T.09 (Figura 1).

Figura 1- Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) em cm/dia de *R. solani* na presença de isolados de *T. asperellum*. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Fonte: Própria.

O crescimento micelial do patógeno foi de 3,64, 4,66, 4,97 e 5,1 cm na presença dos isolados T9, T6, T12 e T52, respectivamente, enquanto que no tratamento testemunha, o crescimento deste foi de 5,77 cm, sendo superior, portanto, àquele na presença dos antagonistas. Isso indicou a inibição *in vitro* do crescimento micelial do patógeno na presença dos antagonistas. Contudo, o isolado T9 (figura 02), foi o que demonstrou maior potencial antagônico contra o patógeno, destacando-se estatisticamente dos outros tratamentos, seguido por T6 e por T12 e T52, que não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do tratamento controle.

Figura 02- Crescimento micelial de *R. solani* na presença de isolado de *T. asperellum* T9. Fonte: Própria.

O isolado que resultou em maior PICR médio do patógeno foi T9, com 42,45%, seguindo do isolado T6 que apresentou 36,80% de inibição e os de mais não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual médio de inibição do crescimento radial (PICR) de *Rhizoctonia solani* por isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria.

Isolados de <i>T. asperellum</i>	PICR (%)
T9	42,45 a
T6	36,80 b
T12	29,55 c
T52	28,75 c
CV(%)	10,95

Resultados semelhantes ao que está sendo relatado no presente estudo foram descritos por Sousa et. al., (2016), onde fungos do gênero *Trichoderma* são relatados como produtores de metabólitos com potencial inibidor sobre fungos como *R. solani* em feijão caupi. Esse gênero também foi eficiente no controle de *R. solani* isolado de morangueiro, onde o antagonista apresentou crescimento micelial médio de 6,8 cm e o patógeno, de 3,1 cm (GUÉDEZ et al., 2009).

A característica antagônica do gênero *Trichoderma* pode ser atribuída tanto pela competição que ocorre com o patógeno, quanto pela produção de antibióticos inibidores de crescimento de outros fungos, como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina (DENNIS; WEBSTER, 1971). Outra possível explicação para sua atividade antagônica é a produção de enzimas hidrolíticas como celulase e hemicelulase, que são responsáveis pela degradação de materiais como lignina e celulose e causam a quebra da parede celular de fungos patogênicos (MELO, 1996).

Sendo assim, esse resultado pode indicar alta capacidade antagônica aos isolados de *R. solani* avaliados e aponta que os isolados de *T. asperellum* testados podem apresentar um elevado potencial para utilização em um manejo integrado de doenças. Além disso, esse estudo também demonstrou que *T. asperellum* poderia apresentar um caráter agressivo, sendo capaz de se estabelecer em um dado ambiente, desde que dadas às condições apropriadas para tal, prevalecendo sobre outras espécies.

Conclusões

Pelos resultados alcançados no experimento, cita-se o antagonismo obtido do isolado T9 de *T. asperellum* como eficiente no controle biológico de *R. solani* que ocasiona damping-off de pós-emergência em plantas de alface, evidenciando o seu potencial para futuros programas de controle biológico da doença.

Referências

ALENCAR, T. A.; TAVARES, A. T.; CHAVES, P. P. N.; FERREIRA, T. A.; NASCIMENTO, I. R. Efeito de intervalos de aplicação de urina bovina na produção de alface em cultivo protegido. **Revista Verde**. Mossoró, v.7, n.3, p. 53-67, 2012.

BARAK, R.; ELAD, Y.; MICRELMAN, O; CHET, I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v.75, p.458-462, 1985.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing, 241 p.1972.

BARNETT, H.L. The nature of mycoparasitism by fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.17, p.1-14, 1963.

BEDENDO, I. P. Damping-off. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**. v.1, cap. 42, p. 820-828. , 1995.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguarina-SP: Embrapa meio Ambiente. p. 7-14, 2009.

CAMPOROTA, P. Antagonism *in vitro* of *Trichoderma* spp. vis-a-vis *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Agronomie**, v.5. p.613-620,1985.

CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: Les antagonismes microbiens. Mode d'action et application à la lutte biologique controle les maladies des plantes. **Colloques de L'I.N.R.A.**, v.18, p.35-40, 1983.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.L HANSON, J.R.; AVENT, G.A. Antigungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, p.503-513, 1987 .

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.25-39, 1971.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.25-39, 1971.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 59-363. 1971.

EZZIYYANI, M.; PÉREZ, S. C.; REQUENA, M. E.; RUBIO, L.; CANDELA, M. E. Biocontrol por *Streptomyces rochei* (Ziyani), de la podre dumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. **Anales de Biología**, n.26, p.69-78, 2004.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, 2002.

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

GOMES, T.M. Efeito do CO₂ aplicado na água de irrigação e no ambiente sobre a cultura da alface (*Lactuca sativa*). Tese (doutorado) – **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, 2001.

GUÉDEZ, C.; CAÑIZÁLEZ, L.; CASTILLO, C.; OLIVAR, R. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos post cosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). **Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología**, v.29, p. 34-38, 2009.

HOWEL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, St. Paul-MN (USA), v. 87, n. 1, p. 4-10. 2013.

KIM, Y. C.; JUNG, H.; KIM, K. Y.; PARK, S. K. An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda, NL, v. 120, p. 373- 382, 2008.

KRUGNER, T. L.; BACHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A. ; KIMATI, H. ; AMORIN, L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: **Ceres**, Cap.19, p. 46-95. 1995.

LI, G. Q.; HUANG, H.C.; ACHARYA, S.N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotina*. **Biological Control**, San Diego, v.28, p.11-18, 2003.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M. **Doenças da alface**. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS, (Circular Técnica, 14), p.18, 1998.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295, 1996.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, Barcelona-Spain, v.4, p.1-4, 2001.

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

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.23-54, 1985.

PAVAN, M. A.; KUROSAWA, C. Doenças da alface (*Lactuca sativa* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO L.E.A.; REZENDE, J.A.M (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. v.2: Doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo. Editora Agronômica Ceres, cap.4, p.18-25. 1997.

RAI, B.; SINGH, V.T.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v.57, p.131-135, 1980.

Sala, F.C.; Costa, C.P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.30, n.2, p. 187-194. 2012.

TEIXEIRA-YAÑEZ, L.D.D.; SALA, F.C.; COSTA, C.P.; KIMATI, H. Da raiz às folhas. **Cultivar HF**, v.4, n.20, p. 6-7, 2003.

VAJNA, L. Mutual parasitism between *Trichoderma hamatum* and *Trichoderma pseudokoninggi*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.113, p.300-303, 1985b.