



BIOCONTROLE IN VITRO DE *Lasiodiplodia theobromae* POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp.

SILVA¹, Jonatan Alves; MATOS², Dilânia Lopes; DAVID³, Grace Queiroz;
RAMALHO⁴, Aline Bueno; PERES³, Walmor Moya

¹Graduando de Engenharia Florestal, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT. e-mail: jonataneng.florestal@gmail.com

²Mestre, Universidade Federal do Mato Grosso, Alta Floresta, MT. e-mail: dilan_lopes@hotmail.com

³Professor, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT. e-mail: gracequeirozdavid@hotmail.com, walmorperes@unemat.br

⁴Engenheira Florestal, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT. e-mail: nine_ramalho@hotmail.com

Seção temática: Fitotecnia e Fitossanidade

Resumo: Este trabalho objetivou avaliar o potencial antagonístico de isolados de *Trichoderma* spp. a *Lasiodiplodia theobromae*. O estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos (6 isolados de *Trichoderma* mais testemunha sem antagonista) com 15 repetições. Para avaliar o antagonismo dos isolados de *Trichoderma* ao patógeno, foi utilizada a metodologia de pareamento de cultura. Foi avaliado o crescimento micelial, índice de velocidade do crescimento micelial e potencial antagonístico (atribuição de notas de 1 a 5). Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey 5%. Verificou-se que os isolados de *Trichoderma* spp. influenciaram no crescimento micelial do fitopatógeno e, segundo escala de notas, 4 isolados foram considerados antagonísticos ou eficientes. Assim, os resultados obtidos evidenciaram efeito inibidor de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *L. theobromae*.

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

BIOCONTROL OF *Lasiodiplodia theobromae* IN VITRO BY ISOLATES OF *Trichoderma* spp.

Abstract: This study aimed to evaluate the antagonistic potential of *Trichoderma* spp. the *Lasiodiplodia theobromae*. The study was conducted in the Microbiology laboratory at the University of Mato Grosso, Alta Floresta. The design was completely randomized with seven treatments (6 *Trichoderma* more control without antagonist) with 15 repetitions. To evaluate the antagonistic *Trichoderma* isolates of the pathogen, the method for pairing culture was used. It was rated the mycelial growth speed rate of mycelial growth and antagonistic potential (allocation of notes 1 to 5). Data were subjected to analysis of variance and means compared by Tukey test 5%. It was found that the isolates of *Trichoderma* spp. influenced the mycelial growth of the pathogen and, according to rating scale, four isolates were considered antagonistic or efficient. Thus, the results showed inhibitory effect of the *Trichoderma* spp. on *L. theobromae*.



Keywords: antagonism; mycelial growth; biological control.

INTRODUÇÃO

O controle biológico ou o chamado “Biocontrole” constitui-se em uma alternativa cada vez mais importante, uma vez que, na agricultura convencional, utilizado de forma complementar, contribui para a redução do uso dos agrotóxicos, enquanto na agricultura orgânica, insere-se em substituição a estes produtos (SILVA e MELLO, 2007).

O uso de fungos antagonistas para o controle de doenças de plantas tem despertado interesse nos últimos anos devido, principalmente, às perspectivas crescentes da possibilidade de eficiência de controle, aliado à diminuição do impacto ambiental causados pelos agrotóxicos. Dentre os fungos antagonistas, os mais estudados são os do gênero *Trichoderma* (MELO, 1991).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a agricultura, pois são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas. Atuam também como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (FORTES et al., 2007). Algumas linhagens são capazes de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e produzem também substâncias antifúngicas (antibióticos), apresentando muitas estratégias de sobrevivência (MELO, 1996). Ademais, certos isolados se mostram resistentes aos fungicidas, característica que os fazem potenciais agentes biorremediadores (RESENDE et al., 2004).

No Brasil, *Lasiodiplodia theobromae* encontra-se entre os agentes causais de doenças economicamente importantes principalmente em fruteiras tropicais como acerola (*Malpighia emarginata*), graviola (*Annona muricata*), cacau (*Theobroma cacao*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), caju (*Anacardium occidentale*), coco (*Cocos nucifera*), mamão (*Carica papaya*), manga (*Mangifera indica*) e maracujá (*Passiflora* spp.). Culturas como eucalipto (*Eucalyptus* spp.), seringueira (*Hevea* spp.) e uva, além de outras, também são importantes hospedeiras de *L. theobromae* (DOMINGUES et al., 2011).

Destaca-se no controle de *L. theobromae*, o uso inadequado de agrotóxicos e a agressividade crescente do patógeno. O controle químico por si só não oferece proteção nem controle curativo quando os danos são provenientes do ataque desse organismo, sendo, então, indicada a adoção de uma série de medidas adicionais como o manejo cultural e o controle biológico (TAVARES, 1995).

Tendo em vista a carência de estudos relacionados ao controle biológico de doenças causadas por este patógeno, assim como alternativas ao uso de agrotóxicos, objetivou-se, com este trabalho, avaliar o potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. a *L. theobromae*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT. Foram testados quanto ao potencial de controle biológico a *L. theobromae* quatro isolados de *Trichoderma* sp. (TC 01, TC 02, TC 03 e TC 04), pertencentes à coleção de fungos para controle biológico de fitopatógenos



III SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS

Conservação de solos na Amazônia Meridional

13 a 16 de outubro de 2015 Alta Floresta-MT Universidade do Estado de Mato Grosso

Cáceres, v. 2, n. 1, 2015

ISSN 2358-5978

da Micoteca do Laboratório de Microbiologia da Unemat de Alta Floresta e, dois produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. (PC 01e PC 02).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 15 repetições. Os tratamentos consistiram de 6 isolados de *Trichoderma* spp., mais testemunha sem adição de antagonista apenas com disco do patógeno. Cada parcela foi constituída por uma placa.

Para avaliar o antagonismo dos isolados de *Trichoderma* ao patógeno, foi utilizada a metodologia de pareamento de cultura (confronto direto) descrita por Dennis e Webster (1971), na qual, discos de Ø10 mm, contendo micélios do patógeno e antagonista foram depositados em lados opostos em placas de Petri (Ø 90 mm) a distância de 0,2 cm da borda. O crescimento micelial foi estimado em meio de cultura BDA. As placas foram incubadas em câmara de crescimento BOD com temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12 horas, por período necessário para a testemunha preencher a placa.

As variáveis estimadas foram:

Média de crescimento micelial: obtida pelas medidas diárias do crescimento em diâmetro (mm) da colônia do patógeno;

Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM): 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,

D = diâmetro médio atual da colônia;

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação

Potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp.: avaliado aos sete e aos 14 dias de cultivo pareado, utilizando a escala de notas de Bell et al. (1992), com 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. Nota menor ou igual a 3,0 considerou-se o isolado como antagônico ou eficiente.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *Trichoderma* inibiram o crescimento do fitopatógeno. O pareamento das culturas ocorreu a partir do terceiro dia de avaliação, sendo verificado que as médias de crescimento micelial (Tabela 1) de *L. theobromae* quando pareados com os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram diferença significativa em relação a testemunha, mas não diferiram entre si. Resultados semelhantes, nos quais se verificou inibição de crescimento micelial de



III SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS

Conservação de solos na Amazônia Meridional

13 a 16 de outubro de 2015 Alta Floresta-MT Universidade do Estado de Mato Grosso

Cáceres, v. 2, n. 1, 2015

ISSN 2358-5978

fitopatógenos por isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos por MELLO et al. (2007); MARTINS (2009); LOUZADA (2009); BOMFIN (2010); BONETT et al. (2013).

Foi verificado para o índice de velocidade de crescimento micelial que todos os tratamentos diferiram da testemunha, indicando inibição do crescimento do fitopatógeno na presença dos isolados de *Trichoderma* spp. Vey et al. (2001), relatam que a inibição pode ser explicada pelo fato do antagonista apresentar um crescimento rápido até sobre o patógeno, provavelmente devido a um tipo de estímulo do próprio hospedeiro, sendo uma característica vantajosa para o antagonista na disputa da colonização da área, vencendo o patógeno na competição, por espaço ou por nutrientes.

Bomfim (2010), inferiu que a redução do crescimento da colônia do fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*, na presença de *Trichoderma* spp. poderia ser atribuída a liberação de metabólitos pelos antagonistas.

Tabela 1. Crescimento micelial (3^o e 4^o dia de avaliação) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Lasiodiplodia theobromae* na presença dos produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. e isolados de *Trichoderma* sp. avaliados por meio da técnica pareamento. Laboratório de Microbiologia, Alta Floresta-MT, 2015.

Tratamentos	Crescimento Micelial (mm)		IVCM
	Av. 03	Av. 04	
T ₁ - <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	45,13 a	62,73 a	18,80 a
T ₂ - <i>L. theobromae</i> x PC 01	(*)35,61 b	46,07 b	14,12 b
T ₃ - <i>L. theobromae</i> x PC 02	33,11 b	38,53 c	10,09 c
T ₄ - <i>L. theobromae</i> x TC 01	30,93 b	33,53 c	6,97 d
T ₅ - <i>L. theobromae</i> x TC 02	30,27 b	35,67 c	8,33 d
T ₆ - <i>L. theobromae</i> x TC 03	29,73 b	32,47 c	6,78 d
T ₇ - <i>L. theobromae</i> x TC 04	29,66 b	33,20 c	6,18 d
CV%	12,29	7,69	11,6

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

Para o potencial antagônico de *Trichoderma* spp. contra *L. theobromae* (Figura 1) segundo escala de Bell et al. (1982) ao 7^o dia de cultivo pareado, notas menores ou iguais a 3 foram verificadas para os isolados de *Trichoderma* spp.: TC 01, TC 02, TC 03 e TC 04, repetindo-se no 14^o dia, sendo estes isolados considerados antagônicos ou eficientes. Os demais isolados: PC 01 e PC 02, apresentaram moderado potencial antagônico, notas entre 3 e 4 foram verificadas para ambos os dias. Louzada et al. (2009), verificaram notas menores, iguais e maiores que 3 para isolados de *Trichoderma* testados contra *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e sugerem que além do parasitismo direto, outros mecanismos podem estar envolvidos na ação antagonista de fungos do gênero *Trichoderma*, tais como antibiose e competição (FRAVEL, 2005).

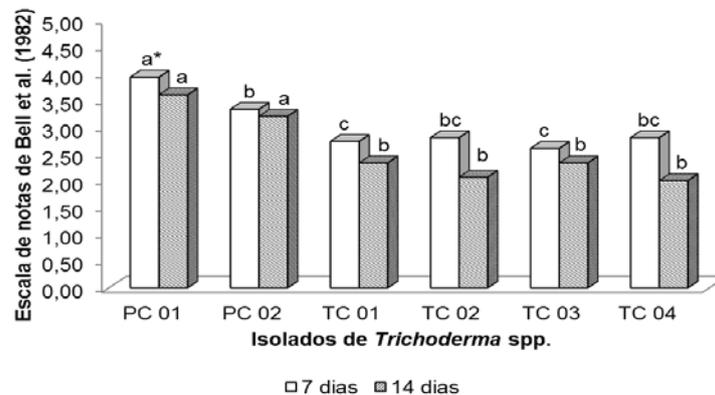


Figura 1. Notas atribuídas ao cultivo pareado de *Lasiodiplodia theobromae* com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. avaliados aos 7 e aos 14 dias após inoculação. Alta Floresta-MT, 2015.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula por variável não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observado neste trabalho, ativo crescimento micelial e esporulação de *Trichoderma* spp. sobre *L. theobromae*, demonstrando alta capacidade competitiva. Matos et al. (2012), também verificou a invasão micelial por *T. viride* sobre *L. theobromae*, confirmando o que foi relatado por Melo (1996), que algumas linhagens de *Trichoderma* apresentam diversidade de estratégias de sobrevivência, que as tornam altamente competitivas no ambiente.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos evidenciaram efeito inibidor de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *Lasiodiplodia theobromae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Sain Paul, 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.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, n. 1, p. 59-363, 1971.
- DOMINGUES, R.J.; TÓFOLI, J.G.; FERRARI, J.T.; NOGUEIRA, E.M.C. Podridão da haste de *Begonia elatior* causada por *Lasiodiplodia theobromae*. Secretaria de



III SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS

Conservação de solos na Amazônia Meridional

13 a 16 de outubro de 2015 Alta Floresta-MT Universidade do Estado de Mato Grosso

Cáceres, v. 2, n. 1, 2015

ISSN 2358-5978

Agricultura e Abastecimento – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios: Instituto Biológico – APTA, 2011. 8 p.

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.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 337-359, 2005.

LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I.; BRAÚNA, 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.

MARTINS, I.; PEIXOTO, J.R.; MENÊZES, J.E.; MELLO, S.C.M. **Avaliação in vitro do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides***. São Paulo: Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 12 p.

MATOS, D.L.; DAVID, G.Q.; Peres, W.M.; EBURNEO, L.; RODRIGUES, C.; FELITO, R.A. Biocontrole de *Lasiodiplodia theobromae* com uso de *Trichoderma viride*, “in vitro”. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 283, 2012.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidade**, v. 11, n. 1, p. 3-9, 2007.

MELO, I.S. Potencialidade de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. p. 135-156.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revista Anual Patologia de Plantas**, v. 4, n. 1, p. 261-295, 1996.

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

RESENDE, M.L.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VON, R.G.P.; VIEIRA, A.R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

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

TAVARES, S. C. C. H. Principais doenças e alternativas de controle. In: EMBRAPA. **Informações técnicas sobre a cultura da manga no Semiárido brasileiro**. Brasília, 1995. p. 123-156.

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.