



PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Lasiodiplodia theobromae*

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 de 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: O objetivo deste trabalho foi verificar a produção de metabólitos voláteis por isolados de *Trichoderma* spp. e o efeito sobre o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*. O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Unemat, Alta Floresta. Foram utilizados 4 isolados de *Trichoderma* sp. pertencentes a micoteca do Laboratório de Microbiologia da Unemat e dois produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp., constituindo-se assim os tratamentos mais testemunha com inoculação do patógeno apenas, com 10 repetições cada. Para efeito de avaliação, placas de Petri contendo meio BDA, foram posicionadas umas sobre as outras, sendo colocado na parte inferior um disco de ágar de 10 mm contendo *Trichoderma* spp. e na superior um disco de *L. theobromae*. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey 5%. Foi verificado que não houve efeito significativo dos tratamentos sobre o crescimento micelial de *L. theobromae*.

Palavras-chave: antibiose, inibição; controle biológico.

PRODUCTION IN VOLATILE METABOLITES ISOLATED FROM *Trichoderma* spp.
ABOUT GROWTH MYCELIAL OF *Lasiodiplodia theobromae*

Abstract: The objective of this study was to investigate the production of volatile metabolites of *Trichoderma* spp. and the effect on mycelial growth *Lasiodiplodia theobromae*. The study was conducted in the Microbiology Laboratory of Unemat, Alta Floresta. Were used 4 isolates *Trichoderma* sp. belonging to the mycology collection of Unemat Microbiology Laboratory and two commercial products based on *Trichoderma* spp., becoming thus the treatments more witnesses with inoculation only pathogen with 10 repetitions each. For effect evaluation Petri dishes containing PDA medium, they were placed one over the other, being placed at the bottom of a 10 mm agar disc containing *Trichoderma* spp. and an *L. theobromae* on the upper disc. Data were subjected to analysis of variance and means compared by Tukey test 5%. It was found that there was no significant treatments effect on the mycelial growth of *L. theobromae*.



Keywords: antibiosis, inhibition, biological control.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado uma crescente preocupação da sociedade, a nível mundial, com os problemas ambientais decorrentes das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura. Resultando na procura de tecnologias de produções rentáveis, eticamente corretas e com perspectivas ecológicas (SILVA e MELLO, 2007). Essa preocupação com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxico está alterando o cenário agrícola, aumentando a busca por mercados de alimentos produzidos sem o uso de agrotóxicos ou aqueles com selos que garantem que os mesmos foram utilizados adequadamente (BETTIOL e MORANDI, 2009).

Segundo Paula Júnior et al. (2008), medidas de controle de doenças de plantas tais como o uso de variedades resistentes, fungicidas químicos e microrganismos antagonistas podem funcionar bem quando empregadas em conjunto, de modo integrado.

Dentre os fitopatógenos de ocorrência no Brasil e de importância econômica, destaca-se *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon e Maublanc, fungo característico das regiões tropicais e subtropicais, onde ocorre em cerca de 500 espécies de plantas (PUNITHALINGAM, 1980). Anteriormente considerado um fungo oportunista, *L. theobromae*, vem se constituindo em um sério problema para produtores em diversos agroecossistemas (FREIRE et al., 2004).

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

Fungos pertencentes ao gênero anamórfico *Trichoderma* são extensivamente mencionados na literatura científica como eficazes agentes de controle biológico de fitopatógenos (LONGA et al., 2009). A atividade antagônica de isolados dessa espécie é atribuída ao efeito sinérgico de vários mecanismos, como competição por nutrientes, produção de enzimas que degradam a parede celular e antibiose (BRUNNER et al., 2005). Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi verificar a produção de metabólitos voláteis por isolados de *Trichoderma* spp. e inibição sobre crescimento micelial de *L. theobromae*.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT, Campus de Alta Floresta. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram quatro (TC 01, TC 02, TC 03 e TC 04), pertencentes à coleção de fungos para controle biológico de fitopatógenos da Micoteca do Laboratório de Microbiologia da Unemat de Alta Floresta e, dois produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp., sendo identificados, por produto comercial 01 (PC 01) e produto comercial 02 (PC 02).



Para verificar a inibição do crescimento do patógeno por meio de metabólitos voláteis, que, eventualmente, são produzidos pelo antagonista, utilizou-se o método de placas sobrepostas (BOMFIM et al., 2010), onde placas de Petri (Ø90 mm) contendo meio BDA, foram posicionadas umas sobre as outras, sendo colocado na parte inferior um disco de BDA de Ø10 mm com micélio de *Trichoderma* spp. e na superior um disco contendo *L. theobromae*. Em seguida, as placas foram vedadas e incubadas em câmara de crescimento B.O.D com temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12 horas, até que a testemunha preenchesse a placa. Cada tratamento foi composto por 10 repetições em delineamento inteiramente casualizado. Para a testemunha foi utilizado apenas discos de *L. theobromae* tanto na parte inferior como na superior da placa de Petri.

Foram avaliadas a média de crescimento micelial, obtida mediante medidas diárias do crescimento micelial (mm) do patógeno, aferidas das colônias localizadas na placa da parte superior com auxílio de uma régua milimetrada. A partir das médias dos valores diários de crescimento micelial de cada tratamento, obteve-se o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM), conforme fórmula proposta por Oliveira (1991):

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

Onde,

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de comparação de médias (Tukey) ao nível de significância de 5%, por meio do Software Sisvar® (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados obtidos e apresentados na Tabela 1, verificou-se que até a avaliação 2 (Av. 02) o comportamento dos tratamentos em relação a testemunha foram semelhantes. No entanto, constatou-se maior crescimento micelial da testemunha em comparação aos demais tratamentos, podendo-se inferir nesse caso uma possível inibição no desenvolvimento micelial de *L. theobromae* devido à produção de metabólitos voláteis pelo antagonista.

Na avaliação final (Av. 03) as menores médias de crescimento micelial foram verificadas nos tratamentos T₇, T₃ e T₆, respectivamente. No entanto, constatou-se que não diferiram significativamente dos demais tratamentos, exceto daquele que apresentou maior média de crescimento (T₄). Nesse caso, o T₄ apresentou crescimento micelial superior ao da própria testemunha, o que indica que não houve a inibição no desenvolvimento micelial, mas um maior estímulo de crescimento, confirmado pelo IVCM, notando-se índice de 10,22.

Foi possível verificar que a testemunha, com discos de *L. theobromae* tanto na parte inferior como na superior da placa de Petri, apresentou crescimento micelial mais ativo na parte inferior da placa, sendo esta colonizada em período de tempo mais curto quando comparada com a colônia localizada na placa da parte superior.



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

Neste caso, o patógeno pode ter sofrido influência em seu crescimento devido a posição em que se encontrava na placa.

Tabela 1. Efeito de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Lasiodiplodia theobromae*. Laboratório de Microbiologia, UNEMAT, Alta Floresta-MT, 2015.

Tratamentos	Crescimento Micelial (mm)			IVCM
	Av. 01	Av. 02	Av. 03	
T ₁ - <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	14,18 a	27,43 a	33,12 ab	8,61 ab
T ₂ - <i>L. theobromae</i> x TC 02	(*)13,97 a	26,83 a	32,75 ab	8,41 ab
T ₃ - <i>L. theobromae</i> x TC 01	13,42 ab	24,32 ab	30,15 b	7,40 b
T ₄ - <i>L. theobromae</i> x PC 01	12,98 ab	26,02 ab	37,14 a	10,22 a
T ₅ - <i>L. theobromae</i> x PC 02	12,58 ab	26,37 a	33,17 ab	9,16 ab
T ₆ - <i>L. theobromae</i> x TC 03	11,50 ab	24,30 ab	30,35 b	8,42 ab
T ₇ - <i>L. theobromae</i> x TC 04	9,70 b	22,37 b	29,20 b	8,61 ab
CV%	15,16	7,39	7,01	12,01

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(*) Diâmetro da colônia de *L. theobromae* (mm).

Em testes de antibiose conduzidos por Bomfim (2010), foi verificado a produção de metabólitos voláteis de espécies de *Trichoderma* spp. havendo uma inibição no desenvolvimento micelial do fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*. Verificou ainda, que o crescimento do fitopatógeno foi reduzido na presença de *Trichoderma* spp. comparando com a testemunha que aos quatro dias já tomava quase 100% da placa. Isaias et al. (2014), verificaram percentual de inibição do crescimento micelial por metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. entre 40% e 60% para *Sclerotium rolfisii* e ação inibitória próximo a 80% para *Verticillium dahliae*.

Segundo Dennis e Webster (1971), espécies de *Trichoderma* são eficientes produtoras de metabólitos voláteis em meio de cultura. Descrevem que os antibióticos voláteis atuam sobre os fungos suscetíveis através da inibição do crescimento micelial. Os resultados obtidos no presente trabalho, podem ser explicados pela não produção de metabólitos voláteis pelos isolados de *Trichoderma* spp. testados e/ou ainda, o fungo *L. theobromae* mesmo na presença de produção destes não foi influenciado em seu crescimento micelial.

Prasad e Kumar (2011) demonstraram que metabólitos antimicrobianos produzidos por *Trichoderma* são eficazes contra uma ampla gama de fitopatógenos fúngicos, por exemplo, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Colletotrichum lagenarium*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Em relação ao efeito de metabólitos voláteis contra *L. theobromae* não se verificou relatos.



CONCLUSÕES

Os resultados do ensaio conduzido in vitro revelaram efeito não significativo de ação antagonista dos isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento do *Lasiodiplodia theobromae*.

AGRADECIMENTOS

À coordenação e pessoal do Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, Alta Floresta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.
- BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I. V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagonista in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.
- BRUNNER, K.; ZEILINGER, S.; CILIENTO, R.; WOO, S.L.; LORITO, M.; KUBICEK, C.P.; MACH, R.L. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3959-3965, 2005.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* - Production of non volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 57, n 1, p. 25-39, 1971.
- FERREIRA D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 1039-1042, 2011.
- FREIRE, F.C.O.; VIANA, F.M.P.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 6 p.
- ISAIAS, C.O.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T.; SILVA, J.P.; MELLO, S.C.M. Ação antagonista e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.
- LONGA, O.C.M.; SAVAZZINI, F.; PERTOT, I. Monitoramento de *Trichoderma atroviride* SC1 em um vinhedo no Nordeste da Itália: Considerações sobre impacto ambiental e controle biológico de *Armillaria mellea*. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 173-183.
- 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.)**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R.R.; CARNEIRO, J.E.S.; ANDRADE, M.J.B.; REZENDE, A.M. **Informações técnicas para o cultivo**



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

do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009. Viçosa: EPAMIG-CTZM, 2008. 180 p.

PRASAD, B.N.; KUMAR, M.R. Effect of non-volatile compounds produced by *Trichoderma* spp. on growth and sclerotial viability of *Rhizoctonia solani*, incitant of sheath blight of rice. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 1, n. 2, p. 37-42, 2011.

PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*.** Vaduz: Pat. J. Cramer, 1980. 123 p.

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: Embrapa, 1995. p. 123-156.