

**ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides*,
AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DE *Euterpe precatória***

**ANTAGONISM OF *Trichoderma* spp. ABOUT *Colletotrichum gloeosporioides*, CAUSAL
AGENT OF ANTRACNOSIS OF *Euterpe precatória***

Keila Kris da Costa¹, Conceição Paula Bandeira Rufino², Paulo Eduardo França de Macedo³, Sônia Regina Nogueira⁴

1. Graduanda da Faculdade do Acre - UNINORTE;
2. Mestrando em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia pela Universidade Federal do Acre;
3. Analista do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Acre;
4. Pesquisadora da Embrapa Acre.

*Autor correspondente: keilavitoriakris@gmail.com

RESUMO

O açaizeiro (*Euterpe precatória*) é uma espécie de grande importância socioeconômica na Amazônia. A antracnose é o principal problema para a produção de mudas e fomento de plantios. O controle biológico é uma alternativa promissora no manejo de doenças de plantas com boa eficiência, baixo custo e impacto ambiental. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antagonista de isolados de *Trichoderma* spp. contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Foram realizadas coletas de amostras de raízes e de solo na área da Embrapa Acre. No Laboratório de Fitopatologia, foram obtidos dez isolados de *Trichoderma* spp. (182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190 e 191) e quatro isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos a partir de folhas de açaí solteiro com sintomas da doença. Foram montados bioensaios de antagonismo entre os fungos, sendo a avaliação feita com a utilização da escala de Bell et al. (1982). Os resultados demonstraram efeito antagonista do *Trichoderma* spp. contra *C. gloeosporioides* e isolados 188 e 191 foram os que proporcionaram os melhores resultados, indicando bom potencial para uso em campo.

Palavras-chaves: Biocontrole; Antagonismo; Açaí solteiro.

ABSTRACT

The assai palm (*Euterpe precatória*) is a species of great economic importance in the Amazon. Anthracnose is the main problem for seedling production and promotion of plantations. Biological control is a promising alternative management of plant diseases with good efficiency, low cost and environmental impact. The objective of this study was to evaluate the potential of isolated antagonist of *Trichoderma* spp. against the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. Collections were made of roots and soil samples in the area of Embrapa Acre. In plant pathology laboratory, were obtained ten isolates of *Trichoderma* spp. (182 183 184, 185, 186, 187, 188, 191, 189 and 190) and four isolates of *C. gloeosporioides*, obtained from the leaves of acai berry with symptoms of the disease. Were mounted bioassays of antagonism between the fungus and the assessment made by the use of Bell et al. (1982) scale of notes. The results showed effect antagonist of *Trichoderma* spp. against *C. gloeosporioides* and isolated 188 and 191 were the ones that provided the best results, indicating great potential for use in the field.

Keywords: Biocontrol ; Antagonism; Acai single.

1. INTRODUÇÃO

O açaizeiro, *Euterpe precatoria*, conhecido popularmente como açaí solteiro, é uma espécie nativa e de grande importância socioeconômica para a Amazônia [1] [2]. A espécie é encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Pará [3]. Devido ao seu potencial de aproveitamento da matéria-prima, a exploração do açaí gera renda para populações tradicionais, pequenos e médios agricultores, além movimentar uma importante cadeia de valor voltada para uso da polpa de açaí [1]. A exploração inicial do açaizeiro ocorreu por meio de extrativismo, entretanto o aumento da demanda por sua polpa, com possibilidade de aumento de renda, estimulou os plantios, que se iniciaram a partir da década de 1990 [4]. Os plantios de açaizeiro ocorreram primeiramente em áreas de várzea e de terra firme localizadas em regiões com maior precipitação pluviométrica, e foram conduzidos tanto em sistemas solteiros e consorciados, com e sem irrigação [4].

Atualmente, o mercado nacional do açaí tem demanda crescente, tanto pela comercialização da bebida *in natura* (suco), bem como da polpa congelada. Com o aumento da demanda por açaí, novos plantios veem sendo formados [5].

O estímulo a novos plantios tem demandado grande produção de mudas de *Euterpe precatoria*, no entanto, alguns problemas como a alta taxa de mortalidade de mudas no viveiro e no campo ocasionado por doenças têm reduzido a quantidade e qualidade das mudas, o que dificulta a implantação de novas áreas [6].

No Acre, a principal doença na fase de produção de mudas e início de plantio é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. O manejo adequado dessa doença é fundamental para o sucesso de implantação de novos campos de produção. Entretanto, poucas medidas de controle foram avaliadas nas condições do Acre, sendo necessário elucidar os aspectos epidemiológicos do patossistema, e avaliar estratégias a fim de que se consiga estabelecer manejo eficiente da doença [6].

Na busca por este manejo, o controle biológico surge como medida de grande potencial de uso, inclusive podendo ser integrado a outros métodos de controle. Dentre as vantagens no uso de microrganismos para o controle de doenças está a redução de resíduos, agregação de valor e melhor equilíbrio biológico dos sistemas [7] [8] [9]. O método de controle biológico envolve ações combinadas de fatores bióticos e abióticos do ambiente contribuindo com o equilíbrio natural, sendo assim, muitos organismos pragas potenciais podem ser mantidos em densidades muito abaixo dos níveis de danos [10].

Muitas espécies de fungos apresentam potencial para o controle biológico de fitopatógenos e promoção de crescimento vegetal [9]. O gênero *Trichoderma* esta entre os agentes de biocontrole de doenças de plantas mais estudados no mundo [10], sendo amplamente utilizado na agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle, promoverem o crescimento vegetativo e induzir resistência das plantas aos patógenos [11].

Espécies de *Trichoderma* spp. apresentam como vantagens para uso o potencial de atuarem por diferentes mecanismos de antagonismo como, antibiose pela produção de metabólitos voláteis e não voláteis, micoparasitismo com ação direta sobre o patógeno, indução de resistência e competição por espaço e nutrientes devido a alta taxa de crescimento e habilidade em colonizar tecidos e matéria orgânica [12]. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antagonista de diferentes isolados do fungo *Trichoderma* spp. contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em condições *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), situado a Rodovia BR-364, Km 14 sentido (Rio Branco/Porto Velho), Rio Branco, AC – CEP. 69.908.970.

2.1 OBTENÇÕES DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E *Colletotrichum gloeosporioides*

Para obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp., foram coletadas amostras de solo em diferentes localidades. Cada amostra continha aproximadamente 500 gramas de solo retirado da camada superficial. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos. Posteriormente, em laboratório, foram feitos os isolamentos do fungo. Para isto, uma alíquotas de 10g de cada amostra foi pesada e colocada em erlenmeyers. Em câmara de fluxo laminar, adicionou-se 90 ml de água destilada esterilizada (ADE) e agitou-se por 10 minutos em agitador do tipo Fisher. Foi realizado a diluição em serie da amostra para tubos contendo 9 mL de ADE, até a diluição de 10^{-5} . Das diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram retiradas alíquotas de 200 uL que foram transferidas e espalhadas com alça de Drigalski para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) adicionado de 100ppm de clorofenicol. As placas foram seladas com papel aderente, identificadas e mantidas por até sete dias a 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas, para crescimento das colônias. Diariamente observou-se as placas e as colônias típicas do fungo foram repicadas para novas placas contendo BDA.

Para o isolamento de *Colletrotrichum gloeosporioides* folhas de *Euterpe precatoria* com sintomas típicos de antracnose foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos. Em laboratório procedeu-se o isolamento indireto, no qual fragmentos de 0,5cm² foram cortados entre o tecido sadio/doente. Os fragmentos foram imersos em solução de etanol 70% por 1 minuto, em seguida transferidos para solução de hipoclorito de sódio a 1,25% por 3 minutos, colocados em ADE, e logo em seguida depositados em placas de Petri contendo meio BDA adicionado de 100 ppm de cloranfenicol. As placas foram mantidas em B.O.D. a 25°C (± 2°C), por cinco dias e as colônias típicas foram identificadas e repicadas para novas placas obtendo assim colônias puras. Tanto os isolados de *Trichoderma* spp., quanto os de *C. gloeosporioides* foram preservadas em frascos estéreis de Penicilina contendo ADE, segundo o método de Castellani [13], até sua utilização nos experimentos.

2.2 ANTAGONISMO *in vitro* DE *Trichoderma* spp. SOBRE *C. gloeosporioides*

O antagonismo *in vitro* foi avaliado pelo método do pareamento de colônias em meio de cultura. Para isso um disco de micélio de 9 mm de diâmetro do antagonista e um disco de micélio de igual tamanho do patógeno foram depositados simultaneamente em lados opostos de Placas de Petri de 90mm contendo o meio BDA, adicionado de 100 ppm de cloranfenicol. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25° C com fotoperíodo de 12 horas. Aos 7 e 10 dias de incubação foi realizado a avaliação do antagonismo com uso de escala de notas baseada no critério de Bell [14] adaptado, onde: (1) *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda superfície da placa; (2) *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície da placa; (3) *Trichoderma* e o patógeno ocupam aproximadamente metade da superfície da placa; (4) Patógeno cresce sobrepondo-se sobre a colônia do antagonista (2/3 da placa); (5) Patógeno cresce sobre *Trichoderma* e ocupa toda a superfície da placa.

O experimento foi montado no esquema fatorial 10x4, sendo utilizados 10 isolados de *Trichoderma* spp. versus 4 isolados de *C. gloeosporioides*, conduzido no delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo 01 Placa de Petri = 01 repetição, e repetido por 2 vezes.

Os dados de antagonismo foram submetidos à análise de variância e teste de médias com uso programa SAS 9.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como os experimentos 1 e 2 apresentaram a razão de variâncias (0,079/0,063), valor menor que 7, considerou-se as variâncias como homogêneas pelo critério de Pimentel [15] e procedeu-se a análise conjunta dos dois experimentos.

Não houve interação significativa entre isolados de *Trichoderma* spp. versus isolado de *C. gloesporioides* ($P = 0,4519$). Foi detectado efeito significativo de isolados de *Trichoderma* spp. ($P < 0,0001$).

Os isolados de *Trichoderma* spp. diferiram pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$), sendo os isolados 191 e 188 os mais eficientes. Todos os isolados de *Trichoderma* reduziram o crescimento *in vitro* do patógeno quando comparados à testemunha (tabela 3).

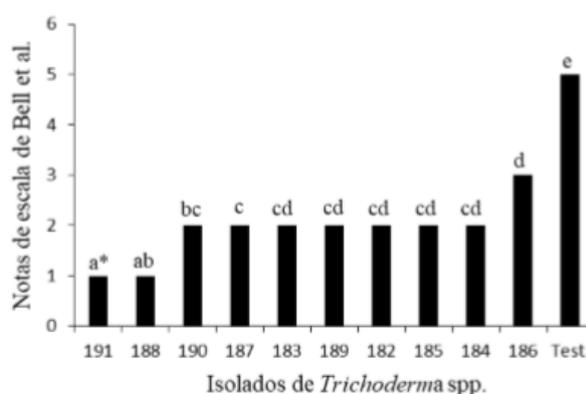


Figura 3. Notas (escala de BELL et al., 1982) atribuídas ao pareamento de *C. gloesporioides* com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. *Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O estudo de antagonismo *in vitro* é uma forma utilizada para auxiliar a seleção massal de agentes de biocontrole. Pelo experimento realizado verificou-se que todos os isolados do antagonista testados, inibiram o patógeno, independente do isolado deste. Observou que em outros estudos, que espécies de *Trichoderma* spp. podem ser seletivas contra diferentes fungos fitopatogênicos [16]. É possível que a redução no crescimento micelial de *C. gloesporioides* observado, possa ter ocorrido devido à liberação de metabólitos pelo antagonista, pela competição de nutrientes no meio de cultura ou por micoparasitismo. Isolados do gênero *Trichoderma* spp. conseguem detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, possivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira [17].

Os testes *in vitro* possibilitam direcionamento para a realização da seleção de isolados, entretanto nem todos aqueles que apresentam efeitos inibitórios *in vitro* conseguem exercer o mecanismo de antagonismo *in vivo* [14]. Desta forma os isolados promissores observados no

presente estudo deverão serem testados em condições de viveiro e campo para controle da doença [18].

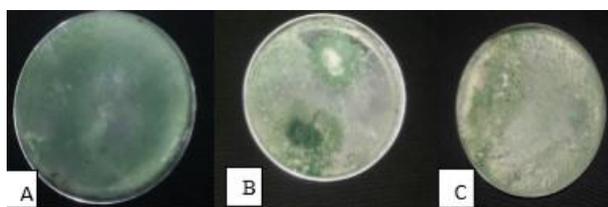


Figura 4. Crescimento micelial e antagonismo de *Trichoderma* spp. (A) - Testemunha. (B) – Sétimo dia de avaliação. (C) - Décimo dia de avaliação.

CONCLUSÕES

Os isolados 188 e 191 foram os que proporcionaram maior antagonismo ao fitopatógeno.

O controle biológico exercido por *Trichoderma* spp. tem grande potencial de controle para antracnose em *E. precatoria*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 468 p.
- [2] FEARNSTIDE, P. M. Reservas Extrativistas: uma estratégia de uso sustentável. **Ciência Hoje**, v.14, n.81, p.15-17. 1992.
- [3] HENDERSON, A. The palms of the Amazon, Oxford, University Pres, New York, 362p, 1995.
- [4] IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro. 2013. 132p.
- [5] OLIVEIRA, M. S. P. de; FERNANDES, G. L. da C. Repetibilidade de caracteres do cacho do açaizeiro nas condições de Belém - PA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3 p. 613-616, 2001.
- [6] NOGUEIRA, S. R. et al. Antracnose em mudas de *Euterpe precatoria* no Acre. **Anais do 46º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Ouro Preto. 2013.
- [7] BARBOSA, F. R. & GONZAGA, A. C. O. 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. 2012.
- [8] MELLO, S.M.C. et al. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v.11, p.1-11. 2007.
- [9] MACHADO, D. F. M. et al. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista Ciências Agrárias**, v.35, n.1, p.274-288, 2012.

- [10] DE MELO M. et al. Antagonismo *in vitro* de *trichoderma* sp. contra *sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.9, n.1, 2015.
- [11] FORTES, F. O., et al. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Forestry Sciences**, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.
- [12] CAMPOROTA, P. Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. **Agronomie**, v. 5, n. 7, p. 613-620, 1985.
- [13] CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.
- [14] BELL, D. K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- [15] PIMENTEL G. F. Curso de estatística experimental. 11.ed. São Paulo, Nobel, 466p. 1985.
- [16] ROCHA, J. R. S. **Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), com espécies de *Trichoderma***. Pernambuco, Recife, 1997. 147 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, 1997.
- [17] HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p.43-56, 2004.
- [18] WELLS, H.D. et al. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent for *Sclerotium rolsfsii*. 1972.