



***Trichoderma* SPP. NO BIOCONTROLE AO *C. gloeosporioides* AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM CAJUEIRO**

***Trichoderma* SPP. IN THE BIOCONTROL TO *C. gloeosporioides* CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN CASHEW**

João Marcos Rodrigues dos Santos^{1*}; Tancio Gutier Ailan Costa²; Natália Moura de Vasconcelos Beleza³; Christiana de Fátima Bruce da Silva³; Carlos Alberto Kenji Taniguchi⁴; Adriana Guirado Artur¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Fortaleza, Ceará, Brasil.

² Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Serópedica, Rio de Janeiro, Brasil.

³ Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Patologia da Pós-colheita, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁴ Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Solos, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*Autor correspondente: João Marcos Rodrigues dos Santos E-mail: joaorodriguesestagio.embrapa@gmail.com

Resumo

Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam grande potencial para o biocontrole de doenças de plantas. Neste sentido, objetivou-se avaliar o potencial antagonístico de nove cepas de *Trichoderma* spp. no biocontrole *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose em cajueiro. Para tal, foi conduzido ensaio pelo método da cultura pareada em laboratório, sendo o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* repicado três dias antes dos antagonistas. Após sete dias de incubação foi realizada medições em direções perpendiculares do diâmetro da colônia do patógeno, sendo calculada a porcentagem de inibição do crescimento. As cepas de *Trichoderma* spp. foram agrupadas em classes. As cepas estudadas foram capazes de inibir o crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. Contudo, ainda são necessários os estudos *in vivo*, a fim de confirmar este potencial e recomendar o método de controle biológico para a antracnose do cajueiro.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*, controle biológico, microbioma do solo.

Abstracts

Species of the genus *Trichoderma* have great potential for the biocontrol of plant diseases. Thus, the objective was to evaluate the antagonistic potential of nine strains of *Trichoderma* spp. *in vitro* biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* causal agent of anthracnose in cashew plants. For this purpose, an assay was conducted using the laboratory paired culture method, with the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* being replicated three days before the antagonists. After seven days of incubation, measurements were taken in perpendicular directions of the pathogen colony diameter, and the percentage of growth inhibition was calculated. The strains of *Trichoderma* spp. were grouped into classes. The strains studied were able to inhibit mycelial growth *in vitro* of *Colletotrichum gloeosporioides*. However, *in vivo* studies are still needed in order to confirm this potential and recommend the biological control method for cashew anthracnose.

Keywords: *Anacardium occidentale*, biological control, soil microbiome.



INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta perene, típica de regiões de clima tropical e considerado de natureza rústica [1]. Dados apresentados pelo [2] apontam que a área ocupada pelo cajueiro no Brasil em 2017 era de 505,5 mil hectares, sendo a região Nordeste a principal produtora com cerca de 99,5% dessa área. Nesse cenário, o Estado do Ceará se torna o principal produtor com uma área de 311,543 mil hectares o que representa cerca de 61,6% da área nacional.

Ao longo dos anos a cajucultura tem apresentado queda na produtividade devido a problemas fitossanitários, pomares heterogêneos, baixa fertilidade dos solos, falta de manejo e doenças que devastam os pomares, dentre as enfermidades de origem fúngica destaca-se a antracnose [3] [4] [5].

A antracnose é uma das mais severas doenças que atacam os pomares de cajueiro nas mais diversas regiões do Brasil. É ocasionada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Os sintomas ocorrem nos tecidos jovens, apresentando manchas necróticas de coloração amarronzada em folhas novas e com tonalidade avermelhada em folhas mais velhas, além de proporcionar deformidades nas folhas [6].

Em função da baixa eficiência de agroquímicos e dos riscos ambientais advindos do seu uso crescente, agentes de controle biológico, especialmente as cepas de *Trichoderma* [7], tem se destacado como um método bastante promissor no manejo de doenças de plantas. Os fungos do gênero *Trichoderma* apresentam diversos benefícios para a produção agrícola, tais como a indução do crescimento vegetal, solubilização de minerais e o controle biológico [8] [9] [10] [11].

Pesquisas com o uso do controle biológico têm revelado o potencial desse gênero fúngico como antagonista a fitopatógenos [12] [13]. O potencial decorre devido à presença, nestes microrganismos, de mecanismos de ação, dentre os quais se destacam: o micoparasitismo, resultante da produção e liberação de compostos como, gliotoxina, quitinase e glucanases pelo antagonista com ação direta sobre o patógeno [14]; e da capacidade de produção de diversos metabólitos secundários [15] [16]. Nesse sentido, espécies de *Trichoderma* podem diferir quanto à atividade antagônica *in vitro* sob o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em cajueiro.

Neste cenário, objetivou-se avaliar o potencial antagônico de nove cepas de *Trichoderma* spp. no biocontrole *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia Pós-colheita da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE), cujas coordenadas são latitude de 3°44'S e longitude 38°33'W.



Sete das nove cepas de *Trichoderma* utilizadas nesse experimento (LPPC 226 - *Trichoderma* spp., LPPC 231 - *Trichoderma* spp., LPPC 238 - *Trichoderma* spp., LPPC 299 - *Trichoderma longibrachiatum*, LPPC 300 - *Trichoderma longibrachiatum*, LPPC 301 - *Trichoderma ghanense* e, LPPC 304 - *Trichoderma* spp.) fazem parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Patologia Pós-colheita da Embrapa Agroindústria Tropical (Tabela 1).

Tabela 1. Código e local de coleta das cepas utilizadas no experimento.

Cepas	Local
Ecotrich - (<i>Trichoderma harzianum</i>)	Produto comercial
Trichodermil - (<i>Trichoderma harzianum</i>)	Produto comercial
LPPC226 (<i>Trichoderma</i> spp.)	Boa Vista-RR
LPPC231 (<i>Trichoderma</i> spp.)	Boa Vista-RR
LPPC238 - <i>Trichoderma</i> spp.	Boa Vista-RR
LPPC299 (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>)	Pacoti - CE
LPPC300 (<i>Trichoderma ghanense</i>)	Baturité - CE
LPPC301 (<i>Trichoderma ghanense</i>)	Limoeiro do Norte - CE
LPPC304 (<i>Trichoderma</i> spp.)	Palmácia - CE

Estes microrganismos foram coletados em áreas produtoras dos Estados do Ceará e Roraima e foram isolados da rizosfera de bananeiras sadias, conforme procedimentos descritos por [17]. As autorizações para coleta dos microrganismos foram concedidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMbio) com o número: 47806-1. E as atividades de acesso ao Patrimônio Genético foram cadastradas no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen) com o número: ADA72BA e A974700. Além disso, foram utilizadas duas cepas de produtos comerciais (Ecotrich - *Trichoderma harzianum* e Trichodermil - *Trichoderma harzianum*).

Para avaliação do antagonismo das cepas de *Trichoderma* contra o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizou-se o método de cultura pareada.

Para tal, realizou-se sete dias antes do ensaio a ativação dos microrganismos, repicando-se discos de micélio dos mesmos, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata dextrose ágar). Após o crescimento dos microrganismos e obtenção da cultura pura, realizou-se a repicagem do patógeno fúngico três dias antes do antagonista, dispondo-o no lado oposto da placa contendo meio BDA [18]. Como testemunha, foi utilizado o patógeno cultivado isoladamente, adicionando-se um disco de micélio (5 mm) no centro das placas. As placas foram incubadas em incubadora tipo BOD, sob temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 h (claro/escuro).

Aos sete dias após a repicagem dos antagonistas realizou-se medições em dois sentidos perpendiculares do diâmetro da colônia do patógeno, com auxílio de paquímetro digital. Com os



dados obtidos foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de acordo com a equação 1.

$$(Eq.1), \% \text{ de inibição do crescimento (PIC)} = \frac{\text{Cresc.test.} - \text{Cresc.trat.}}{\text{Cresc.test.}} * 100$$

Onde; Cresc.test: crescimento micelial da testemunha; Cresc.trat: crescimento micelial do tratamento.

Com os dados obtidos foi possível agrupar as cepas antagonistas em classes, de acordo com escala descrita por [19]. Esta escala define o grau de antagonismo por meio da divisão em cinco classes de notas (notas: 1: controle total; 2: controle de 75%; 3: controle de 50%; 4: controle de até 25%; 5: ausência de controle).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições (cada repetição foi constituída por uma placa de Petri, e, cada cepa de *Trichoderma* correspondeu aos tratamentos). Os dados foram submetidos à análise de variância, e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico AgroEstat [20].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cepas de *Trichoderma* spp. foram eficientes na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Houve diferenças significativas, a nível de 5% de probabilidade, para todas as cepas testadas. As melhores inibições do crescimento micelial do patógeno foram realizadas pelas cepas: LPPC-238, LPPC-301, LPPC-300, Ecotrich, LPPC-304, LPPC-231, LPPC-226, LPPC-299 (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetro médio da colônia do patógeno (DCM) de *Colletotrichum gloeosporioides* (LPPC 140) na presença de cepas de *Trichoderma* spp. pelo método da cultura pareada.

Tratamentos	DMC (mm)**
Controle	65,40 a
Trichodermil	56,60 b
LPPC299	45,37 c
LPPC226	44,14 c
LPPC231	43,35 c
LPPC304	43,12 c
Ecotrich	42,45 c
LPPC300	42,04 c
LPPC301	41,27 c
LPPC238	40,97 c

*Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **DCM: Diâmetro médio da colônia do patógeno.

A redução do crescimento micelial pode ser justificada por mecanismos de ação, como a exsudação de metabólitos secundários pelo antagonista, a absorção dos nutrientes contidos no meio de cultura quando comparado ao patógeno e, bem como pelo micoparasitismo [22] [23].



Em relação ao potencial das cepas de *Trichoderma* em inibir o crescimento micelial do patógeno, houve diferenças significativas do tratamento Trichodermil e as demais cepas testadas. O tratamento Trichodermil apresentou a menor inibição do crescimento micelial (Tabela 3), e consequentemente maior diâmetro médio da colônia do patógeno (Tabela 2).

Tabela 3. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (LPPC 140) por cepas de *Trichoderma* spp. pelo método de cultura pareada.

Tratamentos	% de inibição
LPPC 238	37,35 a
LPPC 301	36,88 a
LPPC 300	35,71 a
Ecotrich	35,08 a
LPPC 304	34,05 a
LPPC 231	33,71 a
LPPC 226	32,08 a
LPPC 299	30,62 a
Trichodermil	13,45 b

*Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diferentemente dos resultados encontrados, [24], estudando o antagonismo *in vitro* e *in vivo* de agentes de biocontrole contra *C. lindemuthianum*, verificaram inibição máxima de 59,48% do crescimento micelial do patógeno por isolados de *Trichoderma viride*, *harzianum* e *hamatum*.

Quanto à classificação das cepas conforme a escala de [19] observa-se que a cepa comercial (Trichodermil) foi a que obteve o pior desempenho, obtendo nota 3,00 (Tabela 4; Figura 1), enquanto as demais cepas se mostraram eficientes em inibir o crescimento do patógeno. Estatisticamente a cepa LPPC301 não diferiu das demais, porém obteve nota (2,00).

Tabela 4. Classificação das cepas de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo a *Colletotrichum gloeosporioides* (LPPC 140), conforme escala descrita por Bell [19] (1982).

Tratamentos	Nota
Trichodermil	3,00 a
LPPC301	2,00 b
LPPC304	1,80 b
LPPC226	1,60 b
LPPC300	1,60 b
LPPC299	1,60 b
LPPC231	1,40 b
LPPC238	1,40 b
Ecotrich	1,40 b

*Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

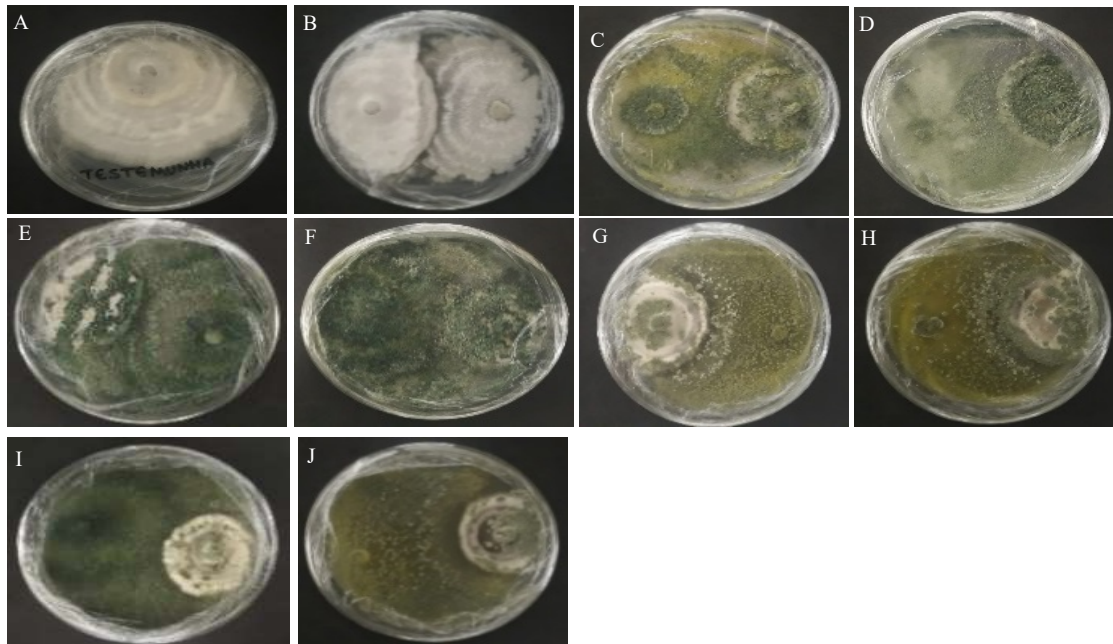


Figura 1. *Trichoderma* no biocontrole in vitro do *Colletotrichum gloeosporioides*, sete dias após a repicagem do patógeno. *(A) Testemunha; (B) Trichodermil; (C) Ecotrich; (D) LPPC226; (E) LPPC231; (F) LPPC238; (G) LPPC299; (H) LPPC300; (I) LPPC301; (J) LPPC304.

Os dados obtidos corroboram com os de [25], que investigando o antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides* verificaram que as cepas estudadas foram capazes de reduzir o crescimento micelial da colônia do patógeno. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo apresentaram maiores inibições do crescimento micelial do patógeno, segundo a escala de [19] Bell (1982).

O potencial do fungo *Trichoderma* no biocontrole de doenças de plantas é imenso, podendo sua utilização ser mais incentivada e estudada para aplicação na agricultura.

CONCLUSÃO

As cepas de *Trichoderma* spp. testadas no presente estudo foram eficientes na redução do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo potenciais candidatas para o biocontrole da antracnose. Contudo, ainda são necessários os estudos *in vivo*, a fim de confirmar este potencial e recomendar o método de controle biológico para a antracnose do cajueiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico de Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor sob processo de nº BMD-0008-01029.01.08/18. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida ao segundo autor sob processo de nº 140266/2019-4. A



Embrapa Agroindústria Tropical pela estrutura física e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio de recursos do PROAP sob processo de nº 23067.037245/2019-31. Ao pesquisador Dr. Daniel Schurt, da Embrapa Roraima, por coletar e ceder as cepas de *Trichoderma* oriundas de Boa Vista-RR.

REFERÊNCIAS

- [1] MATOS, V. A. T.; PIVETTA, F.; PAIVA SOBRINHO, S.; TISSIANI, A. S. O.; PEREIRA, A. P. M. S. Temperaturas basais e exigência térmica para a maturação de caju. **Bioscience Journal**, v. 30, n.4, p. 969-977, 2014.
- [2] IBGE. **Levantamento sistemático da Produção Agrícola**. Fortaleza: IBGE/GCEA-CE. Outubro 2018. Documento impresso.
- [3] MESQUITA, J. B. R.; PAIVA, J. R.; MARQUES, G. V.; NUNES, A. C. Efeitos da compatibilidade entre porta-enxerto vs enxerto de cajueiro comum em viveiro. **Agropécuaría Técnica**, v. 31, n.1, p. 49-57, 2010.
- [4] ANJOS JUNIOR, O. R.; CIRÍACO, J. S.; PAIXÃO, M. C. S. Produtividade da castanha de caju no estado do Ceará: uma análise de convergência. **Extensão Rural**, v. 24, n. 4, p. 65-85, 2017.
- [5] SOUZA, A. C.; VIEIRA, G. H. C.; NEVES, L. M. Uso de óleos essenciais no controle do *Colletotrichum gloeosporioides* causador na antracnose no caju. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1709-1715, 2019.
- [6] GAMARRA-ROJAS, G.; SILVA, N. C. G.; VIDAL, M. S. C. Contexto,(agri) cultura e interação no agroecossistema familiar do caju no semiárido brasileiro. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 34, n. 3, p. 315-338, 2017.
- [7] MCLEAN, K. L.; HUNT, J. S.; STEWART, A.; WITE, D.; PORTER, I. J.; VILLALTA, O. Compatibility of a *Trichoderma atroviride* biocontrol agent with management practices of Allium crops. **Crop Protection**, v. 33, [s.n] p. 94-100, 2012.
- [8] BROTMAN, J.; KAPUGANTI, G.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, n. 9, p. 390-391, 2010.
- [9] BHARDWAJ, D.; ANSARI, M. W.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 66, p. 1-10, 2014.
- [10] KANG, S. M.; KHAN, A. L.; WAGAS, M.; YOU, Y. H.; KIM, J.; KIM, J. G.; HAMAYUN, M.; LEE, I. J. Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 673-682, 2014.
- [11] GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Agricultural Microbiology**, v. 82, [s.n] p. 1-9, 2015.
- [12] ATANASOVA, L.; LE CROM, S.; GRUBER, S.; COULPIER, F.; SEIDL-SEIBOTH, V.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC Genomics**, v. 14, n.121, p. 1-15, 2013.
- [13] MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. 1ª Ed. Brasília, 2019.
- [14] OSORIO-HERNÁNDEZ, E.; CASTILLO-HERNÁNDEZ, F. D.; MORALES, G. G.; HERRERA-RODRÍGUEZ, R.; REYES-CASTILLO, F. *In-vitro* behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 19, p. 4594-4600, 2011.
- [15] CRUTCHER, F. K.; PARICH, A.; SCHUHMACHER, R.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; KENERLEY, C. M. A putative terpene cyclase, *vir4*, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 56, [s.n] p. 67-77, 2013.
- [16] CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUES, L.; DEL-VAL, E. K.; LARSEN, J. Ecological



functions of *Trichodermas* pp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n.4, p. 1-17, 2016.

[17] ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª Ed. Viçosa, 2006.

[18] DENNIS, C.; WEBSTER. J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n.1, p. 363-369, 1971.

[19] 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.

[20] ALMEIDA, W. K. D. S. Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum* spp., *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em fruteiras tropicais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n.1, p. 1374-1378, 2009.

[22] MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. 1ª Ed. Brasília, 2019.

[23] VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; WOO, S. L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, [s.n] p. 127-139, 2014.

[24] PADDER, B.A.; SHARMA, P. N. *In vivo* and *in vivo* antagonism of biocontrol agents against *Colletotrichum lindemuthianum* causing bean anthracnose. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 44, n.10, p. 961-969, 2011.

[25] COSTA, K. K.; RUFINO, C. P. B.; MACEDO, P. E. F.; NOGUEIRA, S. R. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose de Euterpe precatória. **South American Journal**, v. 6, n.1, p. 391-397, 2019.