

Boletim de Pesquisa 193 **e Desenvolvimento**

ISSN 1676 - 340
Dezembro, 2007

**Avaliação in vitro do antagonismo de
Trichoderma spp. sobre *Colletotrichum
gloeosporioides***



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 193

Avaliação in vitro do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*

Irene Martins

José Ricardo Peixoto

José Eustáquio Menêzes

Sueli C. M. Mello

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 945 Avaliação in vitro do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides* / Irene Martins ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
12 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 193).

1. *Colletotrichum gloeosporioides* - fungo. 2. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 3. Maracujazeiro. 4. Controle biológico. I. Martins, Irene. II. Série. 632.96 - CDD 21.

Avaliação in vitro do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*

Irene Martins¹

José Ricardo Peixoto²

José Eustáquio Menêzes³

Sueli C. M. Mello⁴

Resumo

Estudou-se o potencial antagônico de 20 isolados de *Trichoderma* spp. contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do maracujazeiro, sob condições de laboratório. A avaliação do antagonismo foi feita por meio de cultivo pareado e por produção de metabólitos tóxicos. No cultivo pareado, procedeu-se à inoculação no meio de batata-dextrose-ágar (BDA), com disco de micélio do patógeno (CEN 419) e, após cinco dias de crescimento, inoculou-se os isolados de *Trichoderma*. A avaliação da inibição do crescimento do patógeno foi realizada pela medição do diâmetro das colônias, aos 12 dias após o pareamento. Na avaliação dos isolados quanto à produção de metabólitos tóxicos, estes foram cultivados em meio de batata - dextrose (BD), por 12 dias, sob agitação contínua. Após este período, a massa fúngica foi filtrada com o auxílio de uma bomba de vácuo e a parte líquida, centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi esterilizado, através de membrana Millipore (0,45 μ m), e adicionado ao meio BDA na proporção de 25% (v/v). Em seguida, foi distribuído em placas de Petri, sendo colocado um disco de micélio do patógeno no centro da placa. Medidas de diâmetros das colônias foram tomadas aos 12 dias de cultivo. As análises de variância (teste F) e as comparações de médias através do teste de Tukey ao nível de 5% de significância, foram executadas com a utilização do software ESTART[®]. Os isolados de *Trichoderma* spp. são classificados como altamente antagonistas pelo teste de pareamento.

Termos para indexação: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, controle biológico.

¹ Bióloga, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Eng. Agr.º, PhD., Universidade de Brasília

³ Eng. Agr.º, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Eng. Agr.º, PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

The antagonistic potential of 20 isolates of *Trichoderma* spp. Was studied against the fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of anthracnose of passionfruit, under laboratory conditions. The evaluation of antagonism *in vitro* was first made by means of confrontation cultures and tests of toxic metabolites. The confrontations were set up by inoculating potato-dextrose-agar (BDA) plates with mycelial discs of the pathogen (CEN 419), which after five days of growth, was inoculated with the isolates of *Trichoderma*. The evaluation of growth inhibition of the pathogen was carried through by the measurement of the diameter of the colonies, 12 days later. The toxic metabolites produced by the isolates were evaluated from potato-dextrose (BD) cultures, under continuous agitation for 12 days. After this period, the fungal mass was removed by filtration with the aid of a vacuum pump and the liquid fraction centrifuged at 15,000 rpm per 15 minutes. The supernatant was sterilized by filtration through a Millipore membrane (45 μ m) and added to BDA medium in the ratio of 25% (v/v) which was then distributed in Petri dishes. A mycelial disc of the pathogen was placed in the center of the plate, and the diameters of the colonies measured after 12 days of growth. The analysis of variance (F test) and the comparisons of averages by the Tukey test at the 5% level of significance were done using ESTART ® software. All the isolates inhibited the growth of the pathogen, in both the confrontations and in the of toxic metabolite tests.

Index terms: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, biological control.

Introdução

A antracnose é causada pelo o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo, que possui ampla gama de hospedeiros, infectando principalmente maracujazeiro, goiabeira, mangueira, mamoeiro e cajueiro (SANTOS FILHO e SANTOS, 2003).

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), cultivado em todo o País, vem sendo atacado por várias doenças que depreciam a qualidade do fruto, reduzem a produtividade e a longevidade da cultura. Essas doenças são causadas por diversos patógenos, principalmente, por fungos – antracnose (*C. gloeosporioides*), verrugose (*Cladosporium herbarum*) e septoriose (*Septoria passiflorae*), por bactéria e por vírus (JUNQUEIRA et al., 2003; NASCIMENTO, 2003).

A antracnose ocorre em épocas quentes e chuvosas, podendo incidir de maneira drástica no caule, ramos, folhas, flores e, principalmente, em frutos desenvolvidos, prejudicando a produção e a qualidade do produto para a comercialização e a industrialização (ROCHA et al., 1998; VIANA e COSTA, 2003).

A utilização dos 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).

Rocha (1997) testou o potencial de vários isolados de *Trichoderma* para o controle biológico de *C. gloeosporioides* em frutos e folhas de maracujazeiro, concluindo que todos os isolados foram capazes de reduzir a área necrosada por *C. gloeosporioides* em frutos. Já em folhas de maracujazeiro, somente o isolado de *T. koningii* se mostrou promissor.

O trabalho avaliou 20 isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao potencial para o controle biológico de *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose do maracujazeiro-amarelo, sob condições de laboratório.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados com os isolados de *Trichoderma asperellum* (CEN 162 e CEN 201), *T. fertile* (CEN 211), *T. harzianum* (CEN 139, CEN 140, CEN 143, CEN 151, CEN 153, CEN 155, CEN 168, CEN 170, CEN 219, CEN 254 e CEN 255), *T. koningii* (CEN

142 e CEN 208), *T. longibrachiatum* (CEN 280), *T. pseudokoningii* (CEN 209) e *T. sp.* (CEN 400 e CEN 405), pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *C. gloeosporioides* em cultura pareada

A verificação do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra o patógeno *C. gloeosporioides* (CEN 419) foi realizada utilizando-se a metodologia de cultura pareada descrita por Dennis e Webster (1971a, b). Inicialmente, procedeu-se à inoculação do meio de batata-dextrose-ágar (BDA) com disco de micélio-ágar de 5 mm de diâmetro do patógeno e, após cinco dias de crescimento deste, inocularam-se os isolados de *Trichoderma* em extremos opostos da placa. A incubação ocorreu em câmaras BOD a 27°C, no escuro. Os isolados foram classificados quanto ao antagonismo segundo escala de Bell et al. (1982).

A avaliação da inibição do crescimento do patógeno foi realizada pela medição do diâmetro das colônias, aos 12 dias após o pareamento, período em que as placas da testemunha (inoculadas apenas com o patógeno) apresentaram-se totalmente colonizadas. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado com 20 tratamentos, cada tratamento composto de quatro repetições, sendo que cada parcela foi constituída por uma placa.

Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *C. gloeosporioides* por metabólitos tóxicos

A avaliação da inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* pela produção de metabólitos tóxicos foi a descrita por Moretto et al. (2001), que consistiu no cultivo dos isolados de *Trichoderma* em meio de batata-dextrose (BD) por 12 dias, sob agitação a 150 rpm, no escuro. Após este período, a fase líquida foi coletada em papel de filtro, centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos, esterilizada em membrana Millipore 0,45 µm e, então, adicionada ao meio BDA, na proporção de 25% (v/v). O meio foi distribuído em placas de Petri e após solidificação, cada placa recebeu um disco de micélio-ágar do patógeno, o qual foi colocado no centro da placa. As placas foram incubadas em BOD a 27°C, no escuro. As medidas de diâmetros das colônias foram tomadas aos 12 dias de cultivo, período em que o crescimento do patógeno nas placas (sem filtrado de cultura de *Trichoderma*) testemunhas atingiu toda a superfície do meio. Adotou-se o delineamento experimental utilizado em cultura pareada.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste F, ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram comparadas entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o software ESTART® (UNESP).

Resultados e Discussão

Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *C. gloeosporioides* em cultura pareada

Todos os isolados inibiram o crescimento do patógeno, e a análise de variância mostrou que não houve diferença significativa entre isolados (Figura 1).

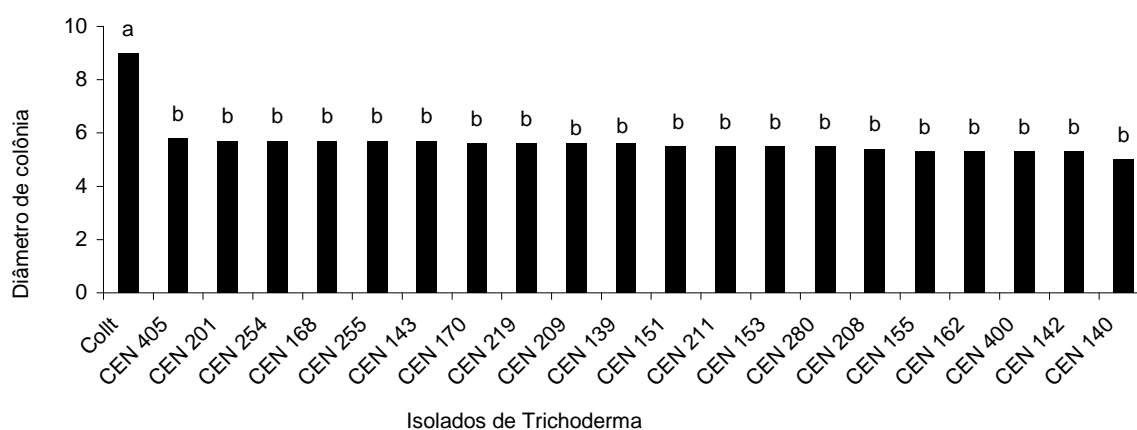


Figura 1. Redução de crescimento de *C. gloeosporioides* causado por *Trichoderma* spp. em cultura pareada. Collt = *Colletotrichum* (testemunha). Barras referidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

De acordo com a escala de Bell et al. (1982), os isolados foram classificados como altamente antagonistas. O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* (CEN 219, CEN 201, CEN 208, CEN 162 e CEN 400) a *C. gloeosporioides* (CEN 419), foi verificado após 12 dias do pareamento, período que a testemunha levou para encher totalmente a placa de Petri (Figura 2). O isolado CEN 208, que recebeu nota dois, mostra onde o *Trichoderma* inibe o crescimento do patógeno, mas não verificou esporulação sobre este (Figura 2D). Nos isolados que foram altamente antagonistas e receberam nota um, apresentaram esporulação sobre o fitopatógeno (Figura 2B, C, E e F).

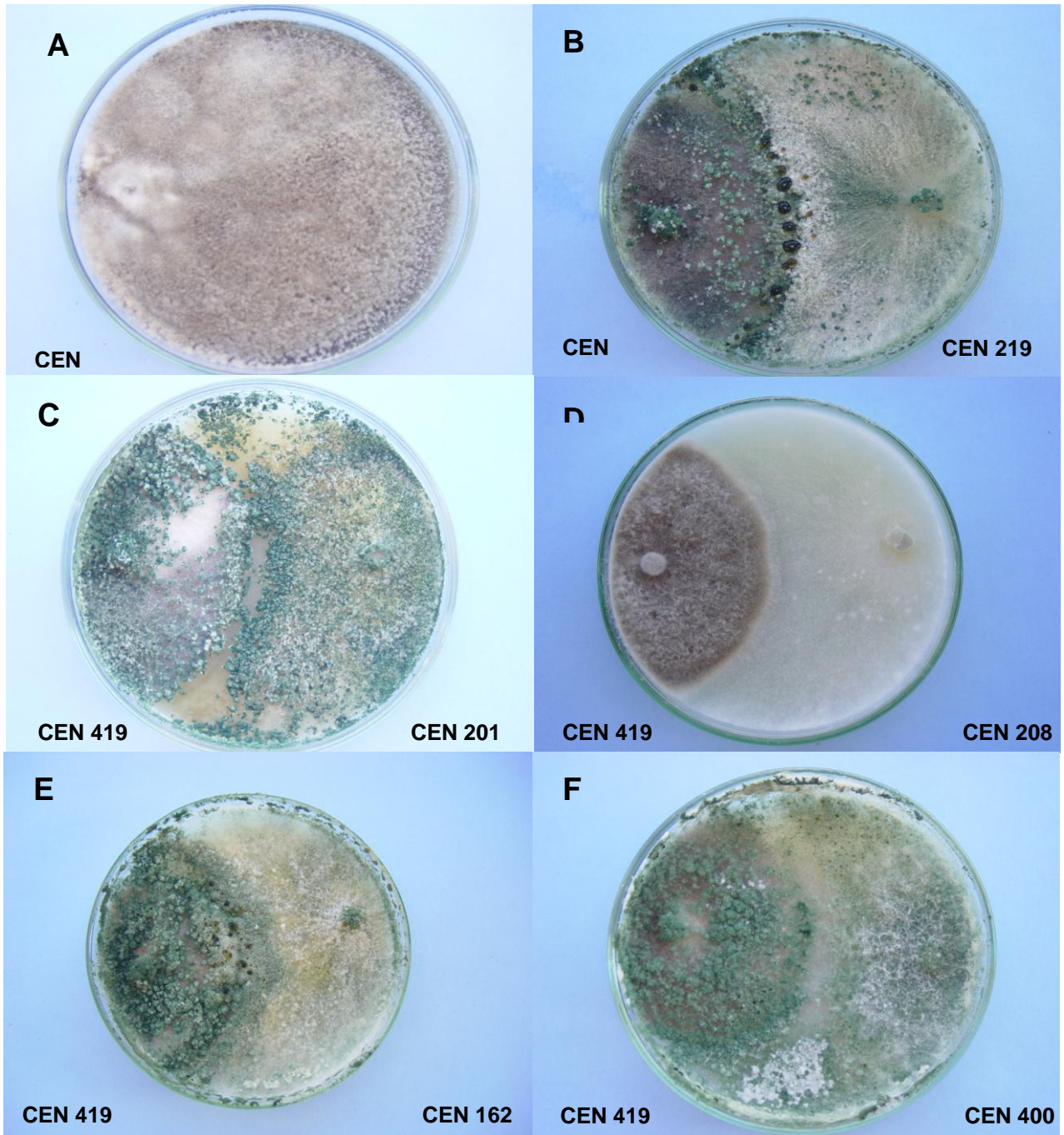


Figura 2. Inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* (CEN 419) por isolados de *Trichoderma* spp. aos 12 dias.

Rocha (1997), trabalhando com controle biológico de *C. gloeosporioides* com espécies de *Trichoderma*, e utilizando esse mesmo método em maracujazeiro, observou a ocorrência de sobreposição das colônias e diminuição da esporulação de *C. gloeosporioides* por diferentes isolados de *Trichoderma*. Já Moretto et al. (2001), estudando in vitro o efeito de isolados de *Trichoderma* spp. em *C. acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos

cítricos, verificaram que todos os isolados de *Trichoderma* inibiram o crescimento micelial de *C. acutatum* quando pareados em meio de cultura. Mello et al. (2007), trabalhando com *Sclerotium rolfsii* Sacc., verificaram a inibição desses patógenos pelos isolados de *Trichoderma* spp. A ocorrência de espécies de *Trichoderma* na sobreposição da colônia de *Pythium*, esporulação sobre *Pythium* e formação de um halo de separação foram observados por Matsuura e Menezes (1999).

O fato do antagonista apresentar maior esporulação sobre o patógeno, é 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 (Rocha et al., 1998). De acordo com Bell et al. (1982) a redução do crescimento micelial e diminuição da esporulação do patógeno podem ser devido ao micoparasitismo direto pelos antagonistas, produção de antibióticos que podem interferir no desenvolvimento do fitopatógeno.

Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *C. gloeosporioides* por metabólitos tóxicos

Na verificação da inibição de *C. gloeosporioides* pela produção de substâncias tóxicas não voláteis, verificou-se que todos os isolados testados, reduziram o crescimento do patógeno. Porém, houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que os isolados CEN 219, CEN 162, CEN 201 e CEN 400 se destacaram dos demais, proporcionando redução de 81,5, 81,2, 78,3 e 65,0%, respectivamente (Figura 3).

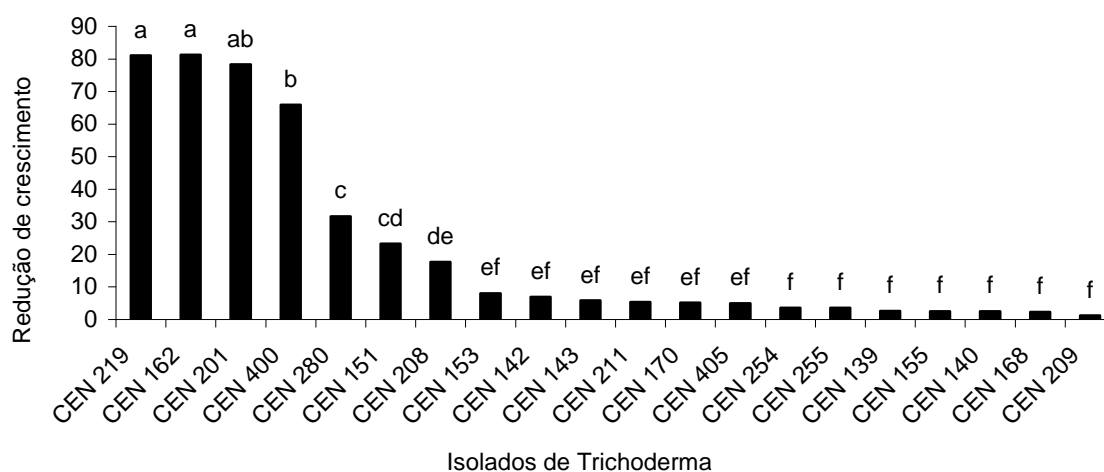


Figura 3. Porcentagem de redução de crescimento de *C. gloeosporioides* por metabólitos de *Trichoderma* spp. Barras referidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

Moretto et al. (2001) demonstraram a inibição de *C. acutatum* por *Trichoderma* spp., tanto em cultura pareada, quanto pela produção de metabólitos tóxicos. Efeito inibitório sobre o crescimento e alterações na morfologia de *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*, quando exposto a filtrados de *Trichoderma viride* e *T. harzianum*, também, foi relatado por Calistru et al. (1997). Mello et al. (2007) demonstraram o potencial antagonístico de isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento de *S. rolfsii* por meio de metabólitos tóxicos.

Conclusões

1. Os isolados de *Trichoderma* spp. são classificados como altamente antagonistas pelo teste de pareamento.
2. Todos os isolados testados, reduzem o crescimento do patógeno *C. gloeosporioides*, devido à produção de substâncias tóxicas não voláteis.
3. Houve diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de metabólitos tóxicos, onde os isolados CEN 219, CEN 162, CEN 201 e CEN 400 de *Trichoderma* se destacaram dos demais, proporcionando redução de 81,5%, 81,2%, 78,3% e 65,0%, respectivamente.

Referências

- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 72, p. 379-382, 1982.
- CALISTRU, C.; MCLEAN, M.; BERJAK, P. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. **Mycopathologia**, Den Haag, NL, v. 137, p. 115-124, 1997.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, I Production of non-volatile antibiotics. **Transactions / British Mycological Society**, Cambridge, GB, v. 57, p. 25-39, 1971a.
- DENNIS, C., WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions / British Mycological Society**, Cambridge, GB, v. 57, p. 363-369, 1971b.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; ANJOS, J. R. N.; SILVA, A. P. O.; CHAVES, R. C.; GOMES, A. C. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, p. 1005-1010, 2003.

MATSUURA, A. B. J.; MENEZES, M. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*). **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, p. 161-164, 1999.

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. **Fitosanidad**, v. 11, n. 1, p. 3-9, 2007.

MELO, I. S. Potencialidades 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. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

MORETTO, K. C. K.; GIMENES-FERNANDES, N.; SANTOS, J. M. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of Tahiti lime detached flowers. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, p. 357-364, 2001.

NASCIMENTO, A. C. **Produtividade, incidência e severidade de doenças em nove genótipos de maracujazeiro-azedo sob três níveis de adubação potássica no Distrito Federal**. 2003. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

ROCHA, J. R. S. **Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), com espécies de *Trichoderma***. 1997. 147 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

ROCHA, J. R. S.; OLIVEIRA, N. T.; MENEZES, M. Comparação da eficiência de métodos de inoculação na avaliação da patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de maracujá (*Passiflora edulis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 41, p. 145-153, 1998.

SANTOS FILHO, H. P.; SANTOS, C. C. F. dos. Doenças causadas por fungos. In: SANTOS FILHO, H. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. (Org.). **Maracujá: fitossanidade**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca Fruticultura; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 12-25. (Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil, 32).

VIANA, F. M. P.; COSTA, A. F. Doenças do maracujazeiro. In: FREIRE, F. das C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Ed.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. p. 108-143.