

Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. contra fungos fitopatogênicos habitantes do solo

Willerding, André Luis¹; Coelho Netto, Rosalee Albuquerque¹ Assis, Luiz Alberto Guimarães¹; Silva, Gilvan Ferreira²; Sousa, Sandra Barbosa¹; Freitas, Sara³; Cristine, Nayara²; Handa, Rogério Eiji¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, ³Universidade Paulista.
Email: alwillerding@gmail.com

Resumo

Para reduzir os prejuízos na produção de hortaliças causados por patógenos habitantes do solo, uma das alternativas é o controle biológico. Este trabalho teve como objetivo avaliar o antagonismo *in vitro* de seis isolados amazônicos de *Trichoderma* spp. provenientes da Coleção de Microorganismos de Interesse Agrossilvicultural - INPA que foram avaliados em experimentos anteriores como controladores da queima-da-saia em alface (*Rhizoctonia solani*) e de podridão-de-Sclerotium (*Sclerotium rolfsii*) em pimentão e tomate. A possibilidade de utilização de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de doenças nas plantas, visando o aumento da renda com a produção orgânica. A partir desses resultados, um desenvolvimento de um bioinsumo poderá ofertar condições melhores de manejar das doenças no estado do Amazonas. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram potencialidade de controlar o fitopatógeno e o isolado do tratamento T-3 (*T. rugulosum*) obteve a melhor resposta nas condições testadas, mostrando-se potencialmente promissor. Outros experimentos de campo deverão validar esses resultados e possibilitar a continuidade do experimento para se chegar em um nível de maturação tecnológica TL-6 visando um produto biotecnológico comercial.

Palavras-Chave: Controle biológico; *Rhizoctonia solani*; *Sclerotium rolfsii*

Introdução

O controle biológico tem se mostrado como uma das melhores alternativas para o controle de doenças de plantas. Fungos do gênero *Trichoderma* são os principais biocontroladores. Comercialmente no Brasil, 34 produtos para controle biológico, à base de espécie de *Trichoderma*, estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Agrofit 2021).

Isolados de *Trichoderma* spp. competem com os patógenos por nutrientes, espaço, produzem metabólitos que modificam as condições ambientais, ativam mecanismos de defesa e promovem o crescimento das plantas (Benítez et al. 2004). Estes mecanismos diretos ou indiretos podem agir coordenadamente e sua importância no processo do controle biológico depende do isolado de *Trichoderma* spp., do fungo antagonista, da cultura hospedeira e das condições ambientais, incluindo a disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e teores de ferro.

A ativação de cada mecanismo implica na produção de compostos e metabólitos específicos, como fatores de crescimento das plantas, enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos e permeases das membranas (Benítez et al. 2004). O efeito na regulação do crescimento das plantas é considerável e vários exemplos indicam a influência positiva de *Trichoderma* spp., como em feijoeiros jovens (*Phaseolus vulgaris* L.), a altura das plantas foi de 160% a 200% e no aumento das massas fresca e seca, de 133% a 217% (Barakat et al. 2006). *Trichoderma* sp. induziu alterações na anatomia de plantas de soja (*Glycine max* L.). Oliveira et al. (2020) observaram o aumento do índice estomático na superfície abaxial das folhas, da espessura do córtex da raiz, da epiderme adaxial, do diâmetro médio do cilindro vascular e da espessura do mesófilo do parênquima lacunoso e concluíram que estas alterações, podem estar relacionadas ao processo de resistência das plantas aos patógenos e a um melhor desempenho contra condições adversas.

Isolados de *Trichoderma* spp. apresentam grande variação genética inter e intraespecífica com relação à produção de metabólitos e mecanismos envolvidos na inibição de patógenos e no estímulo no crescimento das plantas induzindo a produção de ácido indolacético (AIA), sideróforos, solubilizadores de fosfato (França et al. 2017), β -1,3-glucanase (Bara et al. 2003), quitinase (El-Katatny et al. 2000).

No estado do Amazonas, *Rhizoctonia solani* causa doença em vários hospedeiros como alface (*Lactuca sativa* L.), couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) e pepino (*Cucumis sativus* L.) e *Sclerotium rolfsii* ataca pimentão (*Capsicum annuum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal.). As perdas causadas pela podridão-de-*Sclerotium* podem ser maiores que 50% (Fery e Dukes 2002).

Na perspectiva de identificar potenciais inibidores desses patógenos, os bioensaios em laboratório servem para triagem das dezenas ou mesmo centenas de isolados fúngicos que estão depositados na coleção. Essas seleções visam exemplares que podem ser aptos aos próximos passos de avaliação, como experimentos em vaso em casa de vegetação e de campo com plantio comercial para validar um insumo biológico competitivo técnico e comercialmente.

A caracterização molecular e a análise filogenética são ferramentas que permitem que isolados de *Trichoderma* spp., identificados pela análise morfológica, sejam podem ser confirmados em grupos de espécies distintas (Hermosa et al. 2000). A utilização de isolados de *Trichoderma* para o controle de doenças em hortaliças pode ser uma alternativa viável e sustentável, econômica, ambiental e de grande interesse, principalmente com a identificação de isolados adaptados ao solo, o que favorece agricultores orgânicos nas condições amazônicas.

O objetivo desta pesquisa foi analisar a capacidade de antagonismo *in vitro* e de produção de metabólitos funcionais de isolados de *Trichoderma* spp. selecionados como controladores biológicos de doenças causadas por *Rhizoctonia solani* Kühn e *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Material e Métodos

Os bioensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil e os ensaios bioquímicos na Embrapa - Amazônia Ocidental, Manaus. Os isolados de *Trichoderma* spp. e *S. rolfsii* e *R. solani* testados nesta pesquisa pertencem à Coleção de Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Inpa e foram identificados seguindo protocolos específicos (Bric et al. 1991; Carbone e Kohn 1999; Blin et al. 2021; Cai e Druzhinina 2021).

Avaliação do antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp em cultura pareada.

Utilizou-se a metodologia descrita por Tamandegani et al. (2020). Dois discos de colônias, cultivadas em meio BDA, por sete dias, foram inoculados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o mesmo meio de cultura. O disco do fitopatógeno (*R. solani* ou *S. rolfsii*) com 0,5 cm de diâmetro, foi colocado a

1,5 cm do centro da placa e, após 48 h, um disco do antagonista (*Trichoderma* spp.), com as mesmas dimensões, foi inoculado a 3 cm de distância do primeiro disco. Seis isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados em triplicata e após incubação por sete dias a 25°C, foram avaliados na escala de Bell et al. (1982) listados na Tabela 1. A descrição do material biológico utilizado está na Tabela 2.

Tabela 1: Escala ou nível ou tipo de antagonismo estabelecidos para a cultura pareada em discos das cepas para o bioensaios.

Escala de Antagonismo	Situação
1	Colonização completa da placa por <i>S. rolfsii</i> ou <i>R. solani</i> ;
2	Colonização de 2/3 da placa por <i>S. rolfsii</i> ou <i>R. solani</i> ;
3	Colonização de 50% da placa por cada fungo;
4	Colonização de 2/3 da placa por <i>Trichoderma</i> sp.;
5	Colonização completa da placa por <i>Trichoderma</i> sp.

Tabela 2: Isolados de *Trichoderma* avaliados em relação ao antagonismo aos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

Tratamento	Isolado	Espécie
T-1	CMIAINPA 2473	<i>Trichoderma endophyticum</i>
T-2	CMIAINPA 2951	<i>T. asperelloides</i>
T-3	CMIAINPA 2957	<i>T. rugulosum</i>
T-4	CMIAINPA 2959	<i>T. asperellum</i>
T-5	CMIAINPA 2961	<i>T. asperellum</i>
T-6	CMIAINPA 2475	<i>T. albovelutina</i>

Durante sete dias, foi feita a medição do diâmetro das colônias de *S. rolfsii* e *R. solani* com um paquímetro digital, em dois eixos ortogonais, sendo posteriormente calculadas as médias. Esses dados foram utilizados no cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), com uso da Equação 1 descrita em Bastos (1997).

Equação 1: $PIC = (C - T / C) \times 100$, onde PIC = porcentagem de inibição do crescimento; C = crescimento radial (mm) do patógeno controle; T = crescimento radial (mm) do patógeno sobre a influência dos isolados de *Trichoderma* spp.

Ensaio Bioquímico para metabólitos funcionais promotores de crescimento de plantas

Foi realizada uma análise qualitativa da atividade enzimática para a produção de quitinase pelos isolados de *Trichoderma*. Também foi realizada uma avaliação in vitro de traços promotores do crescimento de plantas, como

solubilização de fosfato, produção de sideróforos e produção de ácido indol acético (AIA). Os meios de cultura usados para cada teste são apresentados na Tabela 3, seguindo as metodologias descritas em (Schwyn e Neilands 1987; Roberts e Selitrennikoff 1988; Shekhar 1999). Os bioensaios foram realizados em triplicata e a incubação foi a 28°C por sete dias, e a presença de halos em torno das colônias indica um resultado positivo para as enzimas avaliadas.

Tabela 3: Meios de cultura usados para os ensaios enzimáticos com os isolados.

Meio de cultura	Composição	Atividade enzimática	Referência
Quitinase	Quitina coloidal 10 g; KCL 0,2 g; MgSO ₄ 7H ₂ O 0,2 g; NH ₄ H ₂ PO ₄ 1 g; ágar 15g; 1 L de água destilada.	Presença de halo translúcido ao redor da colônia.	Roberts e Selitrennikoff (1988)
CAS ágar	60,5 mg de CAS dissolvidos em 50 ml de água desionizada e misturados com 10 ml de solução de ferro (III) (FeCl ₃ .6H ₂ O 1 mM, HCl 10 mM) + 72,9 mg de HDTMA dissolvidos em 40 ml de água; 750 ml de água destilada; 15 g de agar; pH ajustado para 7.	Presença de halo amarelo-alaranjado ao redor da colônia	Schwyn e Neilands (1987)
PKV	Glicose 10 g; Ca ₃ (PO ₄) ₂ 5 g; MgCl ₂ .6H ₂ O 5 g; MgSO ₄ 7H ₂ O 0,25 g; KCl 0,2 g; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1 g; 1 L de água destilada.	Presença de halo translúcido.	C.Shekhar Nautiyal (1999)

Ensaio de atividade bioquímica

A produção e quantificação de AIA foi realizada usando um método espectrofotométrico. O sobrenadante da cultura de caldo de 72 horas (200 g. L⁻¹ Batata; 20 g. L⁻¹ dextrose) suplementada com triptofano (100 µg. mL⁻¹) foi misturado em proporção 1:1 com o reagente de Salkowski (50 mL, 35% de ácido perclórico, 1 mL de solução de FeCl₃ 0,5 M). O desenvolvimento de cor rosa indica a produção de IAA descrito por Bric et al. (2013). A leitura da densidade óptica foi realizada a 530 nm e a concentração de IAA foi estimada usando uma curva padrão de IAA puro preparado na faixa de 100-1000 µg. mL⁻¹.

Ensaio de antagonismo *in vitro* entre os isolados de *Trichoderma* x os de *S. rolfsii* e *R. solani*

A inibição do crescimento micelial de colônia de *S. rolfsii* por isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliada por cultivo pareado, em meio de cultura BDA (Mariano 1993). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Aos sete dias de incubação (a 25 °C (± 2 °C), com

fotoperíodo de 12 h por sete dias), o crescimento micelial foi avaliado utilizando escala baseada em Bell et al. (1982).

Resultados e Discussão

Quatro isolados de *Trichoderma* foram positivos para a produção de ácido indol acético sendo que o isolado de *Trichoderma rugulosum* (CMIAINPA 2957) produziu a maior concentração ($162,13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguido pelo *Trichoderma asperelloides* (CMIAINPA 2951) que apresentou produção de $73,33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os isolados de *T. albovelutina* (CMIAINPA 2475) e *Trichoderma asperellum* (CMIAINPA 2959) apresentaram as menores concentrações de $10,66$ e $18,40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 1).

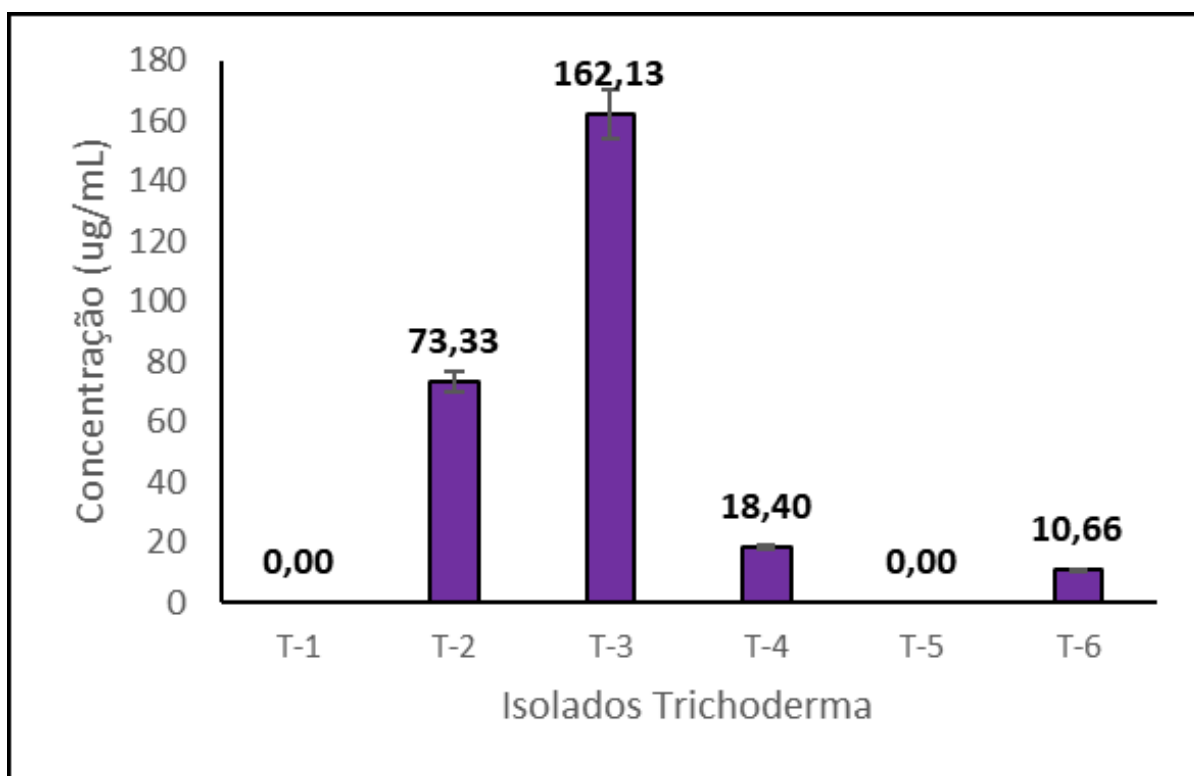


Figura 1: Produção de ácido indol acético (AIA) pelos isolados de *Trichoderma*
T-1 = CMIAINPA 2473 (*Trichoderma endophyticum*); T-2 = CMIAINPA 2951 (*Trichoderma asperelloides*); T-3 = CMIAINPA 2957 (*Trichoderma rugulosum*); T-4 = CMIAINPA 2959 (*Trichoderma asperellum*); T-5 = CMIAINPA 2961 (*Trichoderma asperellum*); T-6 = CMIAINPA 2475 (*Trichoderma albovelutina*).

Para os ensaios enzimáticos, não foram observadas a presença de halo em nenhum dos testes enzimáticos realizados, indicando novos ensaios bioquímicos necessários para reafirmar esses resultados.

Na Figura 2 constam as notas do antagonismo com base em escala de notas adaptada por Bell et al. (1982), onde maior a nota, maior é a inibição do patógeno pelo *Trichoderma*. Dentro de cada experimento com patógenos diferentes, os tratamentos não diferiram entre si. Porém, comparando os resultados entre os patógenos, a eficiência sobre *S. rolfsii* foi significativa com relação ao outro patógeno, indicando o possível controle do fitopatógeno por esse grupo de isolados de *Trichoderma*.

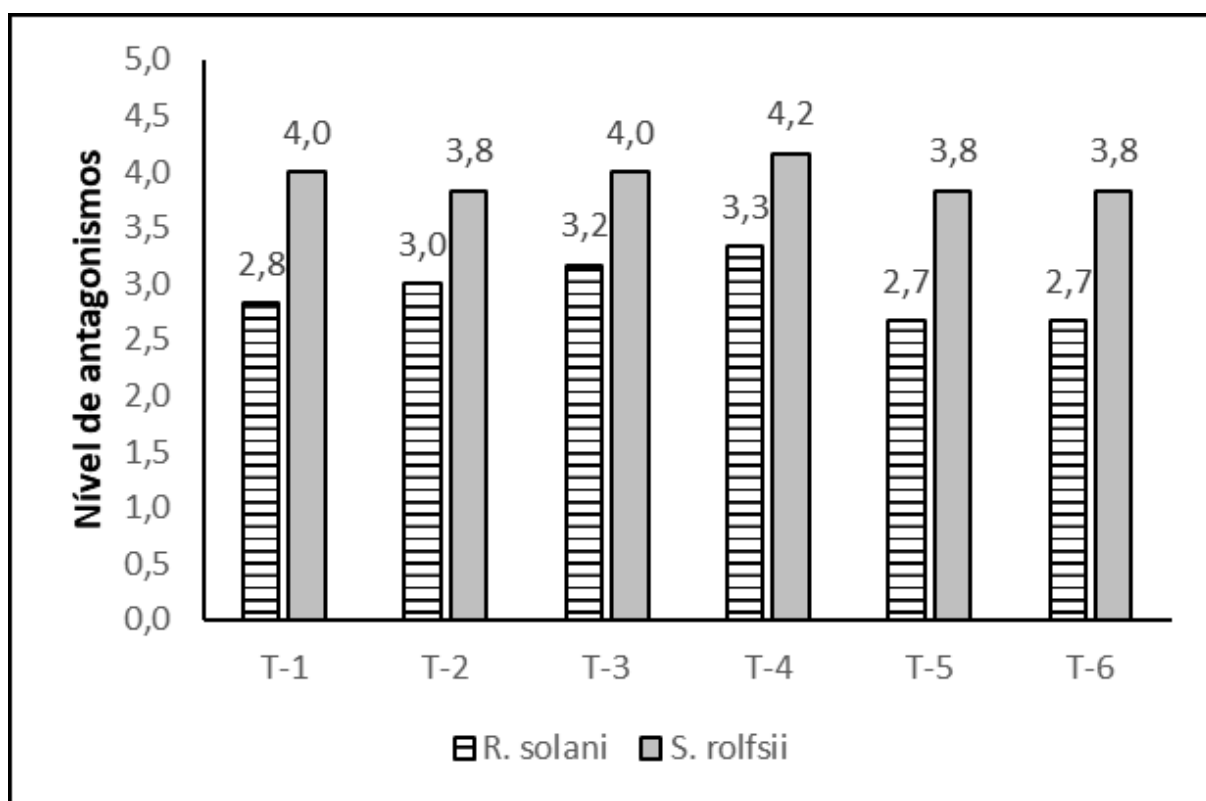


Figura 2: Nível de antagonismos com base em escala de notas adaptada por Bell et al. (1982). Onde: (T-1 = CMIANPA 2473 (*Trichoderma endophyticum*); T-2 = CMIANPA 2951 (*Trichoderma asperelloides*); T-3 = CMIANPA 2957 (*Trichoderma rugulosum*); T-4 = CMIANPA 2959 (*Trichoderma asperellum*); T-5 = CMIANPA 2961 (*Trichoderma asperellum*); T-6 = CMIANPA 2475) (*Trichoderma albovelutina*).

Ao se analisar a porcentagem de inibição de crescimento (PIC) dentro de cada ensaio, não houve diferenças significativas quanto à eficiência na PIC entre os isolados de *Trichoderma*. Todos os isolados de *Trichoderma* testados apresentaram um mesmo padrão de antagonismo. No entanto, ao se comparar

o antagonismo promovido pelos *Trichoderma* spp. aos dois fungos patógenos, percebe-se dois níveis diferentes de eficiência e que são distintos estatisticamente entre si (Figura 3).

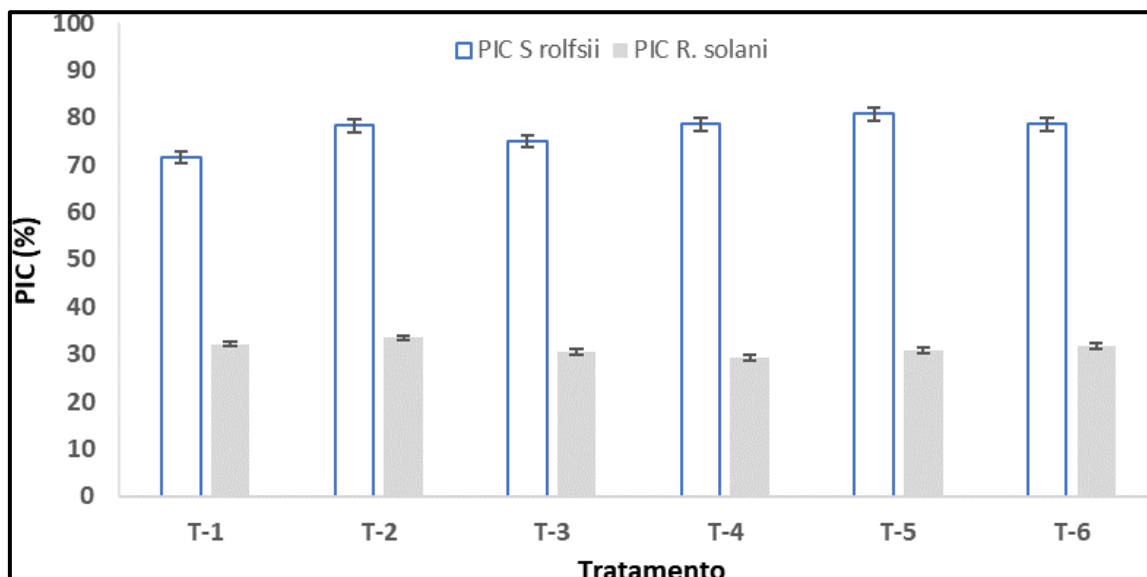


Figura 3: Porcentagem de inibição de crescimento (PIC) em cultura pareada de *Trichoderma* spp. com isolados de *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*. Onde: (T-1 = CMIAINPA 2473 (*Trichoderma endophyticum*); T-2 = CMIAINPA 2951 (*Trichoderma asperelloides*); T-3 = CMIAINPA 2957 (*Trichoderma rugulosum*); T-4 = CMIAINPA 2959 (*Trichoderma asperellum*); T-5 = CMIAINPA 2961 (*Trichoderma asperellum*); T-6 = CMIAINPA 2475) (*Trichoderma albovelutina*).

Para *R. solani*, na média, a PIC variou entre 18.89 a 49.71%, caracterizando uma baixa eficiência dos isolados selecionados nos ensaios *in vitro*. Com relação aos resultados do antagonismo, *S. rolfsii* foi superior e variou entre 62.04 a 87.59%, portanto com variação menor que a apresentada com *R. solani*. Além de maior eficiência no antagonismo, as respostas dispersaram menos entre si. Esses dados indicam que há o potencial dos isolados testados de *Trichoderma*, particularmente para o biocontrole de *S. rolfsii* em cultura olerícolas, mas outros experimentos serão necessários. Na Figura 4 consta a capacidade antagônica dos seis isolados de *Trichoderma* testados para os dois fungos fitopatógenos.

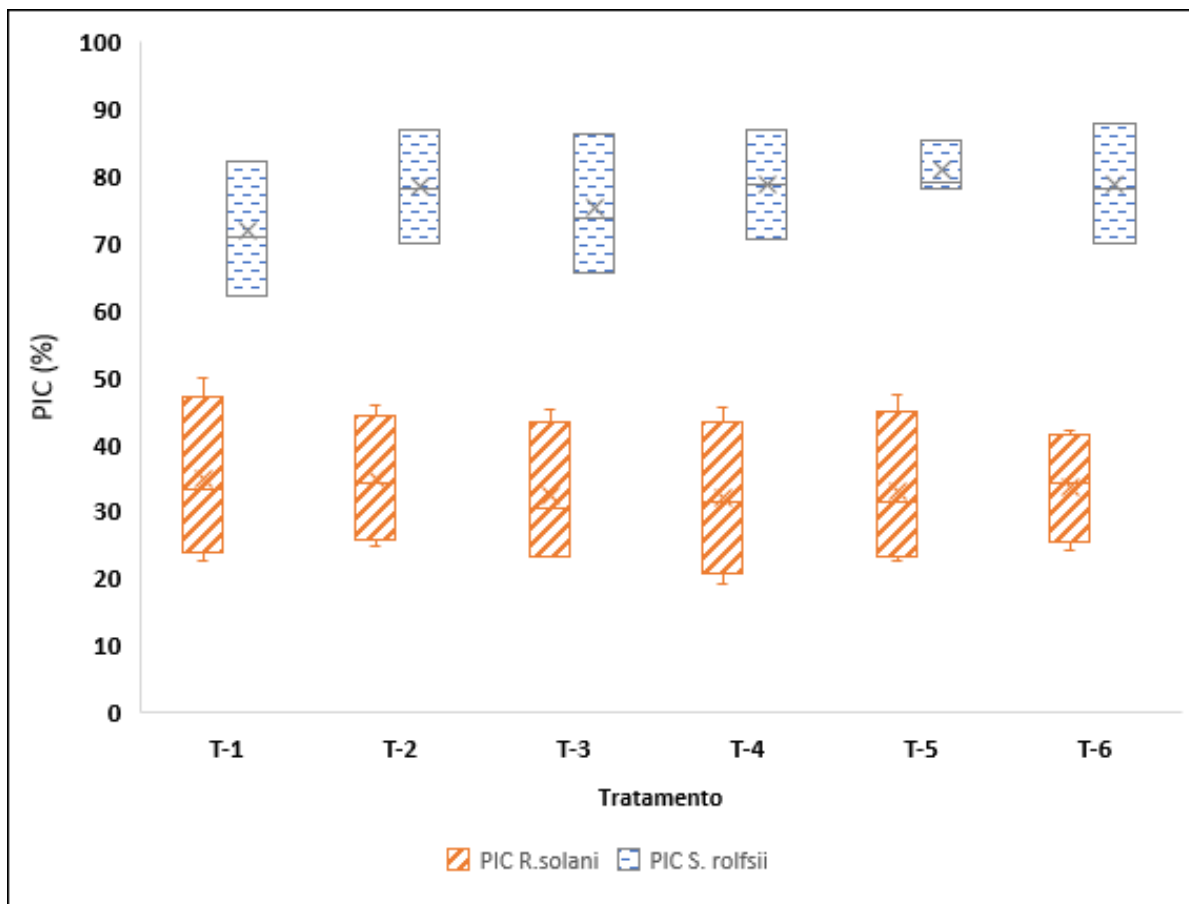


Figura 4: Amplitude da Porcentagem de inibição de crescimento (PIC) como capacidade antagonista de isolados de *Trichoderma*, in vitro com colônias de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Pic = Porcentagem de inibição de crescimento micelial. Onde: (T-1 = CMIAINPA 2473 (*Trichoderma endophyticum*); T-2 = CMIAINPA 2951 (*Trichoderma asperelloides*); T-3 = CMIAINPA 2957 (*Trichoderma rugulosum*); T-4 = CMIAINPA 2959 (*Trichoderma asperellum*); T-5 = CMIAINPA 2961 (*Trichoderma asperellum*); T-6 = CMIAINPA 2475 (*Trichoderma albovelutina*).

Conclusões

Os isolados de *Trichoderma* apresentaram potencial para inibir os patógenos em diferentes escalas para *S. rolfsii* e *R. solani* nos bioensaios *in vitro*. Mais ensaios em campo devem corroborar com os resultados aqui apresentados para a seleção dos isolados mais promissores.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela assistência financeira via Edital: Edital N. 008/2021 - PROSPAM/FAPEAM. Projeto: Isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de doenças em cultivos de interesse econômico no estado do Amazonas.

Referências

- Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - Ministério de Agricultura e Abastecimento. 2021. (https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acessado em 28 de julho de 2021.
- Bara, M.T.F.; Lima, A.L.; Ulhoa, C.J. 2003. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* 219: 81-85.
- Barakat, R.M.; Al-Mahareeq, F.; AL-Masri, M.I. 2006. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. *Hebron University Research Journal* 2(2): 27-47.
- Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C.; Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Bell, D.K.; Wells, H.D.; Markham, C.R. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72(1): 379-382.
- Blin, K.; Shaw, S.; Kloosterman, A.M.; Charlop-Powers, Z.; van Wezel, G.P.; Medema, M.H.; Tilmann, W. 2021. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* 49(W1): W29-W35.
- Bric, J.M.; Bostock, R.M.; Silverstone, S.E. 1991. Rapid in situ assay for indole acetic- acid production by bacteria immobilized on a nitrocelulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2): 535-538.
- Cai, F.; Druzhinina, I.S. 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity* 107(1): 1-69.
- Carbone, I.; Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- El-Katatny, M.H.; Somitsch, W.; Robra, K.H.; El-Katatny, M.S.; Gubitz, G.M. 2000. Production of chitinase and β -1, 3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology* 38: 173-180.
- Fery, R.L.; Dukes Sr., P.D. 2002. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: yield-loss estimates and sources of resistance. *Crop Protection* 21(5): 403-408.
- Franca, D.V.C.; Kupper, K.C.; Magri, M.M.R. 2017. *Trichoderma* spp. isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 47(4): 360-368.
- Hermosa, M.R.; Grondona, I.; Iturriaga, E.A.; Diaz-Minguez, J.M.; Castro, C.; Monte, E.; Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of

biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology* 66(5): 1890-1898.

Mariano, R.L.R. 1993. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1: 369-409.

Tamandegani, P.R.; Marik, T.; Zafari, D.; Balázs, D.; Vágvölgyi, C.; Szekeres, A.; Kredics, L. 2020. Changes in peptaibol production of *Trichoderma* species during in vitro antagonistic interactions with fungal plant pathogens. *Biomolecules* (10): 730.