

Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle biológico de *Sclerotium rolfsii* em tomateiros

Willerding, André Luis¹; Coelho Netto, Rosalee Albuquerque¹; Assis, Luiz Alberto Guimarães¹; Silva, Gilvan Ferreira²; Sousa, Sandra Barbosa¹; Freitas, Sara³; Blind, Ariel Dotto³; Figueiredo, José Nilton Rodrigues³; Hanada, Rogério Eiji¹

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

Resumo

Doenças causadas por patógenos habitantes do solo são de difícil controle e causam sérios prejuízos na produção de espécies olerícolas no Amazonas. A pesquisa avaliou seis isolados amazônicos de *Trichoderma* spp. que mostraram potencial em experimentos anteriores no controle de podridão-de-*Sclerotium* (*Sclerotium rolfsii*) em tomateiro (*Solanum lycopersicum*). O experimento em campo (Estação Experimental Alejo von der Pahlen, do Inpa) serviu para avaliar o efeito dos isolados de *Trichoderma* spp. na redução da severidade e da incidência da doença e relacionar na produção de tomates. Os seis isolados testados foram identificados molecularmente ao nível de espécie. A possibilidade de utilização de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de doenças importantes na produção de hortaliças no estado permitirá um melhor e mais seguro manejo das doenças, ampliando a possibilidade de aumento de renda dos agricultores. Um dos principais impactos está relacionado ao desenvolvimento de um bioinsumo à base de *Trichoderma* que contribuirá para o controle biológico na produção de hortaliças no Amazonas. Outro impacto é relacionado à adoção de controle biológico com consequente redução de gastos com defensivos agrícolas, e com a produção de modo ecologicamente sustentável, o que agrega valor à produção dos agricultores orgânicos. A partir dos resultados desse trabalho, um novo bioinsumo a ser desenvolvido poderá ofertar aos agricultores condições melhores de manejar as doenças e aumentar a qualidade da produção. Após os experimentos, o isolado do tratamento T-3 apresentou a melhor resposta como controle biológico nas condições testadas, mostrando-se potencialmente promissor. Novos trabalhos deverão ser realizados para constatar essa eficiência para se chegar em um nível de maturação tecnológica TL-6 visando um produto biotecnológico comercial.

Palavras-Chave: Controle biológico; *Sclerotium rolfsii*; *Trichoderma* spp.

Introdução

Culturas olerícolas no Amazonas são afetadas por diversas doenças causadas por patógenos habitantes do solo. Neste ambiente, o controle é difícil

porque muitos patógenos produzem estruturas de resistência, que podem sobreviver por anos, mesmo na ausência de plantas hospedeiras. Além disso, há o alto custo dos fungicidas, o desenvolvimento de resistência, consequências indesejáveis do uso desses produtos aos organismos não alvos e o aumento das preocupações com relação ao ambiente e à saúde do solo (Panth et al. 2020).

Doenças causadas por fungos habitantes do solo ocorrem em reboleiras e estão diretamente relacionadas com a densidade de inóculo (Barakat et al. 2006). Rotação de culturas reduz o potencial de inóculo no solo, porém, após o cultivo de uma espécie suscetível, o potencial de inóculo se recupera rapidamente, e a doença volta aos níveis altos, mesmo após períodos longos de rotação (Boine et al. 2014; Brantner e Chanda 2021).

O controle biológico tem se mostrado como uma das melhores alternativas no manejo de doenças de plantas e usado no controle de microrganismos patógenos habitantes do solo e nematoides (Brantner e Chanda 2021). Dos biocontroladores utilizados, grande parte das aplicações têm sido com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. Comercialmente no Brasil, 34 produtos para controle biológico à base de *Trichoderma* spp., 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 como disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura.

No estado do Amazonas, o fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* causa doenças em hospedeiras como pimentão (*Capsicum annuum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal.). As perdas causadas pela podridão-de-Sclerotium podem chegar a mais de 50% (Fery e Dukes Sr. 2002). No Brasil, apesar da escassez de dados sobre perdas na produção decorrentes dessas doenças, estas são consideráveis, pois muitas vezes atingem agricultores familiares sem muitos recursos para combater.

Um dos principais impactos deste trabalho está relacionado ao desenvolvimento de um bioinsumo à base de *Trichoderma* spp. que contribuirá

para o controle biológico na produção de hortaliças no Amazonas. Há também um impacto econômico e ambiental relacionado à adoção de controle biológico pelos agricultores com consequente redução de gastos com a aquisição de defensivos agrícolas aliada a uma produção orgânica, o que agrega valor aos produtos, pois o controle biológico garante a produção de alimentos seguros. Para os agricultores, permitirá um melhor manejo das doenças, ampliando a possibilidade do aumento de renda.

Os objetivos desse trabalho foram selecionar isolados de *Trichoderma* eficientes no controle da podridão-de-Sclerotium (*Sclerotium rolfsii*) em tomateiro para utilização como biofungicida.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida nos laboratórios de fitopatologia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Inpa, e na Estação Experimental Alejo von derPahlem, do Inpa, em Manaus. O isolado de *Sclerotium rolfsii* e seis isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Inpa e foram identificados seguindo os protocolos específicos (Bric et al. 1991; Carbone e Kohn 1999; Blin et al. 2021; Cai e Druzhinina 2021).

Foi avaliada a capacidade de controle da podridão-de-Sclerotium com isolados de *Trichoderma* spp. em tomateiro em um experimento fatorial em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo seis isolados (T-1 a T-6) de *Trichoderma* e duas doses (15 g e 30 g de inóculo por cova) com três testemunhas (T-7, T-8 e T-9), descritos na Tabela 1, com avaliações da incidência da doença aos 15, 28 e 70 dias após o transplante das mudas.

Cada unidade experimental foi constituída por parcela com 15 plantas (3 fileiras com 5 plantas), com 4 repetições, totalizando 60 plantas por tratamento-dose (Dose 1= 15 g; Dose 2 = 30 g). Nos tratamentos testemunha (T-7 e T-8) foram avaliadas apenas a dose comercial dos produtos, totalizando 60 plantas cada tratamento e o mesmo para a testemunha sem controle (T-9), foram 4 unidades amostrais com 15 plantas cada, totalizando 60 plantas. A adubação foi orgânica e química e baseada nas análises do solo, realizadas no Inpa. O inóculo de *S. rolfsii* foi preparado em arroz hidratado por imersão em água e autoclavado (2x) em sacos de polipropileno. Dois discos (0,5 cm de diâmetro) de colônia

foram transferidos para cada saco e incubados por 20 dias, a 26 °C, e inoculados no solo 15 dias antes do plantio, para uniformizar o crescimento do fungo. O inóculo dos isolados de *Trichoderma* spp. cresceu em meio Czapek-Dox conforme Rezende (2017) e depois inoculado no arroz nas mesmas condições.

Resultdos e Discussão

Identificação dos isolados de *Trichoderma*

A Tabela 1 relaciona o material biológico utilizado e identificado além do fungicida comercial.

Tabela 1: Material biológico e fungicida comercial.

Tratamento	Isolado	Espécie
T-1	INPA 2473	<i>Trichoderma endophyticum</i>
T-2	INPA 2951	<i>Trichoderma asperelloides</i>
T-3	INPA 2957	<i>Trichoderma rugulosum</i>
T-4	INPA 2959	<i>Trichoderma asperellum</i>
T-5	INPA 2961	<i>Trichoderma asperellum</i>
T-6	INPA 2475	<i>Trichoderma albovelutina</i>
T-7	Biocontrolador comercial	<i>Tricho-turbo</i> ® (<i>Trichoderma asperellum</i>) (<i>Biovalens Ltda.</i>)
T-8	Fungicida	Metiltiofan® (tiofanato-metílico) (Sipcam Nichino Brasil S.A.)
T-9	Testemunha	Sem controle da doença

Apesar de ocorrer a aplicação de doses diferentes (D-1 = 15g inóculo e D-2 = 30g), houve diferença significativa entre as doses apenas para os Tratamento 3.2 e 2.2, ambos com a dose mais reforçada e mantendo o controle na incidência da doença em torno de 22%. O tratamento T-8 foi superior aos demais tratamentos e os isolados Inpa ficaram agrupados de maneira intermediária com as diferentes doses, pois não diferenciaram entre si e foram inferiores estatisticamente aos demais tratamentos. Notar o desempenho dos isolados INPA comparado com o biocontrole comercial (T- 7), o que demonstra o potencial dos isolados locais, muito provavelmente pela adaptação às condições do solo.

Tabela 2. Incidência de podridão-de-esclerócio em tomateiros tratados com doses de 15 g e 30 g de inóculo de *Trichoderma* (arroz colonizado) aplicado na cova, no momento do transplante das mudas. onde: (T-1 INPA 2473; T-2 INPA 2951; T-3 INPA 2957; T-4 INPA 2959; T-5 INPA 2961; T-6 INPA 2475; T-7 Biocontrolador comercial; T-8 Fungicida; T-9 Testemunha).

Tratamento	Plantas infectadas (%)	SK (p<0.05)
T-8	7%	A
T-3.2	20%	A
T-2.2	22%	A
T-4.1	38%	B
T-4.2	40%	B
T-5.1	42%	B
T-3.1	43%	B
T-6.2	43%	B
T-5.2	47%	B
T-1.2	48%	B
T-2.1	52%	B
T-6.1	52%	B
T-7	60%	B
T-1.1	65%	B
T-9	65%	B

Letras iguais indicam que não há diferenças significativas em teste Scott Knott (p < 0,05).

De maneira geral, houve uma distribuição equitativa da eficiência entre as doses diferentes quando comparados os tratamentos, destacando-se os dois com doses reforçadas. Quando se analisa somente os tratamentos, independente das doses aplicadas, os tratamentos T-3.2 e T-2.2, as doses maiores (30 g) obtiveram as menores incidências. Os outros tratamentos não apresentaram diferenças significativas. Para os tratamentos T-4 e T-5 ocorreu ao contrário. Desta forma, há a necessidade de aprimorar qual dose correta pode ser aplicada, o que pode indicar o uso da menor dose, pensando do ponto de vista econômico. Mas novos experimentos determinarão as concentrações de esporos nas soluções de cultura a ser aplicadas futuramente, visando à aplicação comercial.

Após 70 dias, a incidência da doença variou de 7 casos de incidência (T-8) a 79 plantas infectadas (T-1) o que demonstrou uma variabilidade quanto à capacidade de controle dos isolados, pois isolados de *Trichoderma* spp. apresentam grande variação genética inter e intraespecífica com relação à produção de metabólitos ou mecanismos envolvidos na inibição de patógenos (Shanmugam et al. 2008). Quando se analisa em termos absolutos, tende-se a considerar que o tratamento T-7 bem inferior e menos eficiente do que os isolados (T-1 a T-6).

Quando comparadas as relações entre os casos de incidência e o total de plantas analisadas pelo teste Scott Knott, o tratamento com fungicida (T-8)

apresentou a menor relação de plantas infectadas (7/30), correspondendo a 12% do total das plantas do tratamento. O isolado do tratamento T-3 apresentou uma média de 43% de incidência da doença ao longo do período de avaliação, a menor entre os isolados testados. O tratamento com *Trichoderma* comercial apresentou 62% de suas plantas infectadas (37/60). O tratamento T-1 apresentou 79/120 plantas infectadas (66%), a maior média de incidência ou a menor eficiência apresentada (Figura 1).

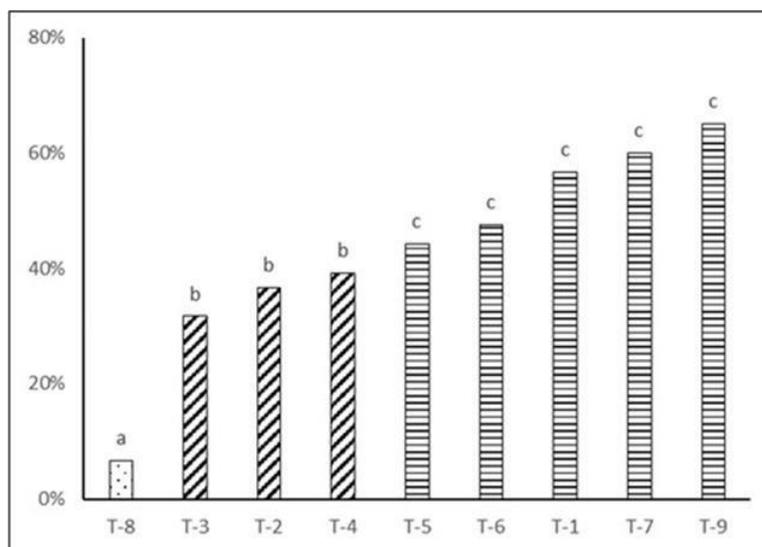


Figura 1. Incidência de podridão-de-sclerotium em tomateiro cultivado em solo infestado com *Sclerotium rolfsii* e tratado com isolados de *Trichoderma* spp. aos 70 dias do transplante. Onde: (T-1 INPA 2473; T-2 INPA 2951; T-3 INPA 2957; T-4 INPA 2959; T-5 INPA 2961; T-6 INPA 2475; T-7 Biocontrolador comercial; T-8 Fungicida; T-9 Testemunha). Letras iguais indicam que não há diferenças significativas em teste Scott Knott ($p < 0,05$).

Ao fim da avaliação somente o tratamento com fungicida (Metiltiofan® -T-8) foi superior aos demais no controle da doença. Porém, percebe-se uma ligeira superioridade dos tratamentos envolvendo quase todos os isolados testados de *Trichoderma* (T-3, T-2 e T-4) quando comparados ao *Trichoderma* comercial (T-7).

Os isolados T-5, T-6 e T-1 apresentaram baixa eficiência no experimento realizado quando comparado aos demais isolados. Esses resultados demonstram a potencialidade dos outros isolados (T-3, T-2 e T-4) para o controle da doença em tomateiro sob condições de solos amazônicos. Ainda há muito trabalho no sentido de melhorar a eficiência desses isolados, além de proporcionar novas formas de aplicação (solução com concentração de esporos

pré-determinada, por exemplo), além de entender as condições ambientais de solo que proporcionem um crescimento e ação antagonista melhor.

O experimento foi conduzido por 70 dias de avaliação no controle da doença, porém também ocorreram avaliações prévias aos 15 e 28 dias. Nessas duas primeiras avaliações, o tratamento com *Trichoderma* comercial (T-7) se apresentou mais eficiente que os isolados do Inpa e ainda houve mais duas reaplicações no tratamento T-7 conforme recomendação do fabricante a cada 10 dias ao longo do experimento, conforme recomendação do fabricante. Nesse sentido, percebe-se que o biocontrole comercial não mantém a eficiência ao longo do tempo, necessitando de reaplicações, mas diminuindo a eficiência ao final do experimento. Para os seis isolados, não houve reaplicações dos isolados Inpa para se igualar ao T-7. No entanto, a não reaplicação mostrou a potencialidade dos isolados testados em relação a resiliência no solo. Pois, em T-7 com reaplicação, houve um decaimento da eficiência quando comparado aos demais *Trichoderma* que não foram reaplicados, especialmente após 21 dias de tratamento.

Quando se analisa a evolução dos tratamentos de controle do fitopatógeno, percebe-se um decaimento no controle. O tratamento com *Trichoderma* comercial diminuiu a eficiência após 28 dias em relação ao controle da doença, mesmo com reaplicações a cada dez dias. Ao se analisar a evolução, o tratamento T-3 esteve sempre entre os melhores tratamentos e termina o experimento apenas inferior ao fungicida químico (T8) (Figura 2).

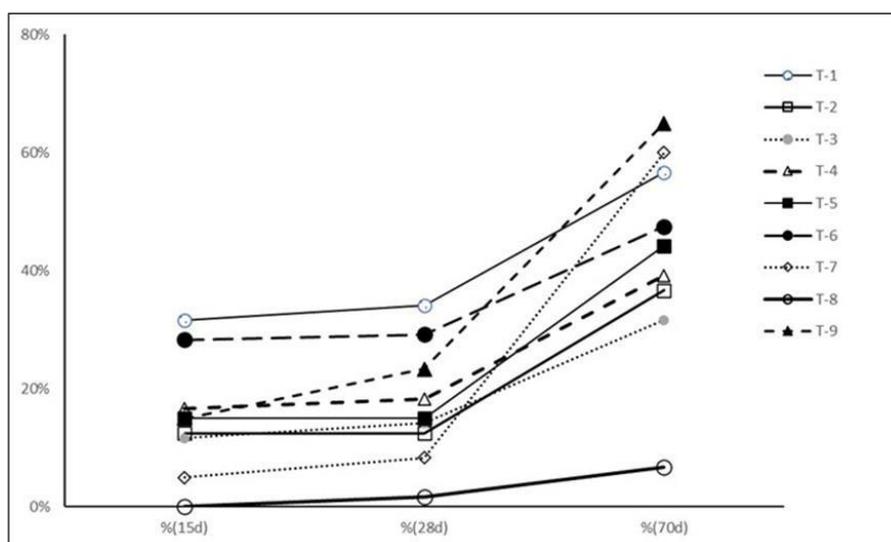


Figura 2. Incidência de podridão de sclerotium em tomateiros cultivados em solo infestado com *Sclerotium rolfsii* e tratados com isolados de *Trichoderma* spp.

Na avaliação do efeito dos tratamentos na produção de frutos verificou-se que o tratamento T-8 e o T-3.2, os mesmos que promoveram melhor controle da doença, e apresentaram uma produção estatisticamente superior aos demais. Entre os *Trichoderma* estudados, novamente o T-3 apresentou a melhor produção média de tomate (kg), demonstrando o seu potencial (Figura 3). Todos os demais tratamentos ficaram inferiores. Quando se compara a incidência, os melhores tratamentos no controle, foram os mais produtivos.

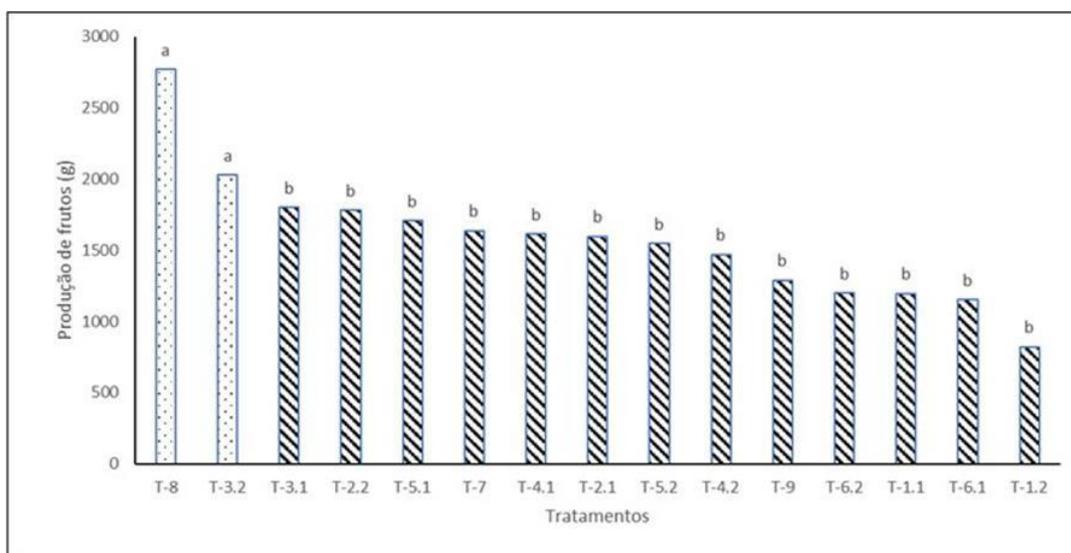


Figura 3. Produção de frutos em tomateiros tratados com isolados de *Trichoderma* e cultivados em soloinfestado com *Sclerotium rolfsii*. onde: (T-1 INPA 2473; T-2 INPA 2951; T-3 INPA 2957; T-4 INPA 2959; T-5 INPA 2961; T-6 INPA 2475; T-7 Biocontrolador comercial; T-8 Fungicida; T-9 Testemunha). a,b significam que letras iguais nos tratamentos não diferem significativamente em teste Scott Knott a 5%.

Conclusão

O isolado do tratamento T-3 apresentou a melhor performance? como controle biológico nas condições testadas, mostrando-se potencialmente promissor.

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.consulata Acessado em 28 de julho de 2021.

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.

Boine, B.; Renner, A-C.; Zellner, M.; Nechwatal, J. 2014. Quantitative methods for assessment of the impact of different crops on the inoculum density of *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB in soil. *European Journal of Plant Pathology* 140: 745-756.

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 nitrocellulose 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.

Brantner, J.R.; Chanda, A.K. 2021. Effects of inoculum density and cultivar susceptibility on rhizoctonia damping-off and crown and root rot in sugar beet. *Plant Disease* 105(4): 1019-1025.

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.

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.