

## ANTAGONISMO *in vitro* DE *Trichoderma* spp. A PATÓGENOS DO CACAUEIRO

Bruno Ferreira de Oliveira<sup>1</sup>, Stela Dalva Vieira Midlej Silva<sup>2</sup>, Marcos Vinicius Oliveira dos Santos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, DCAA, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-000, Ilhéus, Bahia, Brasil.

bruno.ibi@hotmail.com. <sup>2</sup>CEPLAC/CEPEC/Seção de Fitopatologia, Cx. Postal 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco/Centro de Ciências Biológicas, Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

Nove isolados do gênero *Trichoderma* foram testados em dois ensaios *in vitro* com o objetivo de avaliar o potencial antagonístico sobre os fungos *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Ceratocystis cacaofunesta*. Os ensaios foram realizados em duas épocas distintas, utilizando-se a técnica de cultura pareada em BDA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 30 tratamentos e 2 repetições na primeira época e 3 repetições na segunda época, mais as testemunhas. Para avaliação foi utilizada uma escala de notas de 0 a 3. Apenas *T. harzianum* (910) e *T. pseudokoningii* (1052) devem ser testados *in vivo* como possíveis agentes de biocontrole.

**Palavras-chave:** Controle biológico, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora*, *Ceratocystis cacaofunesta*.

**Antagonism *in vitro* of *Trichoderma* spp. to cocoa pathogens.** Nine isolates of the genus *Trichoderma* were tested in two *in vitro* assays to evaluate the potential of antagonistic fungi *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora* and *Ceratocystis cacaofunesta*. Assays were performed at two different times, using the technique of paired culture in BDA. The experimental design was completely randomized design with 30 treatments and two replications in the first season and the second season 3 reps, plus a check. For evaluation we used a scale from 0 to 3. Only *T. harzianum* (910) and *T. pseudokoningii* (1052) should be tested *in vivo* as potential biocontrol agents.

**Key words:** Biologic control, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora*, *Ceratocystis cacaofunesta*.

Doenças como vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), podridão-parda (*Phytophthora palmivora*) e murcha-de-Ceratocystis (*Ceratocystis cacaofunesta*), são responsáveis por grandes perdas na produção de cacau na Bahia, Brasil. Na região sudeste da Bahia, a maior produtora de cacau do país, o controle mais recomendado para essas doenças é a resistência genética, por ser economicamente mais viável e não

poluente. Porém, ainda que o material genético possua resistência, este, por sua vez, não se encontra imune, podendo ser infectado pelos patógenos, daí a grande importância das práticas culturais adotadas como medida de prevenção na disseminação das doenças e uso de agentes biocontroladores.

Espécies do gênero *Trichoderma* são os agentes de controle biológico de doenças de plantas mais estudados

e utilizados no Brasil e em outros países da América Latina (Bettiol et al., 2008). Tal gênero pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Hipocreales e família Hypocreaceae. São fungos de vida livre, ubíquos e altamente interativos na raiz e solo, bem como no interior de plantas (Pomella; Ribeiro, 2009).

Outras características inerentes ao gênero *Trichoderma* que fazem com que seja considerado um bom microrganismo para o controle biológico são: rápido crescimento; poucos requisitos nutricionais; produção de esporos e clamidósporos; produção de enzimas líticas que digerem a parede celular de fitopatógenos; produção de metabólitos voláteis e não voláteis; antibióticos; interferência favorável agindo sobre fatores que regulam o crescimento das plantas; fácil aquisição de resistência aos fungicidas; presença de ciclo parassexual em algumas espécies, o que facilita os estudos de genética clássica; é facilmente mutável por meio de radiações ionizantes, não ionizantes e mutagênicos químicos; e, apresenta conídios uninucleados em muitas espécies, o que facilita a obtenção de mutantes estáveis (Melo, 1991).

Natural do solo, especialmente em solos orgânicos, o gênero *Trichoderma* pode viver tanto saprofiticamente como parasitando outros fungos podendo atuar através de um ou da associação dos mecanismos de parasitismo, antibiose e competição (Melo, 1998).

Com a visão de manter o equilíbrio no agroecossistema, de modo que, o hospedeiro na presença do patógeno não sofra danos significativos, e na tentativa de integrar biocontroladores com resistência de plantas e manejo cultural, o presente trabalho selecionou *in vitro* isolados de *Trichoderma* spp. para avaliar sua atividade antagônica em relação aos três principais patógenos do cacau na Bahia.

O experimento foi realizado no laboratório de Controle Biológico da Seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisas do Cacau, da CEPLAC, em Ilhéus, Bahia, onde nove isolados do gênero *Trichoderma* da Micoteca deste laboratório: *T. harzianum* (889 e 910), *T. longibrachyatum* (4088), *T. pseudokoningii* (854, 909 e 1052), *T. koningiopsis* (4090), *T. stromaticum* (3550) e *T. viride* (905) foram testados como supostos antagonistas aos três principais patógenos do cacau na Bahia: *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Ceratocystis cacaofunesta*.

A atividade antagônica, *in vitro*, dos isolados de *Trichoderma* foi testada através da metodologia de Cultura Pareada (Mariano, 1993), que consiste no confronto entre os três patógenos e cada um dos antagonistas. Em cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA foi depositado um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro do patógeno retirado da margem da colônia e colocado à aproximadamente 1 cm de distância da borda da placa e incubados a 25 °C no escuro. Após cinco dias, no lado oposto em ponto equidistante à borda da placa, foi colocado disco de micélio de *Trichoderma* spp. com o mesmo diâmetro.

Como testemunhas, utilizou-se cultivos puros de cada um dos isolados de patógeno e de *Trichoderma* spp, colocando-se discos de micélio com o mesmo diâmetro no centro de cada placa. Posteriormente as placas com as culturas pareadas e testemunhas foram incubadas a 25 °C no escuro por uma semana.

O experimento foi inteiramente casualizado com 30 tratamentos e para cada tratamento (isolado de *Trichoderma* x patógeno) foram utilizadas duas repetições (placas) na primeira época e três repetições na segunda época.

Para a avaliação do potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma*, foi utilizada uma escala de notas: 0 - impasse; 1- sobreposição marginal; 2 - sobreposição parcial e 3 - sobreposição total e rápida.

A velocidade de crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* spp. foi rápida quando comparada a dos patógenos em estudo, pois em três dias a placa de Petri com 9 cm de diâmetro estava totalmente tomada pelo micélio, enquanto que com os patógenos levou aproximadamente uma semana. Devido a este fato, colocou-se inicialmente os discos dos isolados patogênicos e cinco dias após os de *Trichoderma* spp., para possibilitar que as colônias dos patógenos e supostos antagonistas alcançassem simultaneamente o centro da placa.

Dos nove isolados de *Trichoderma*, cinco isolados: *T. harzianum* (910), *T. longibrachyatum* (4088), *T. pseudokoningii* (1052), *T. koningiopsis* (4090) e *T. viride* (905) receberam nota 3 quando pareados com *C. cacaofunesta*, apenas o *T. pseudokoningii* (854) recebeu nota 2 e três isolados: *T. harzianum* (889), *T. pseudokoningii* (909) e *T. stromaticum* (3550) receberam nota 1 (Figura 1 e Tabela 1).

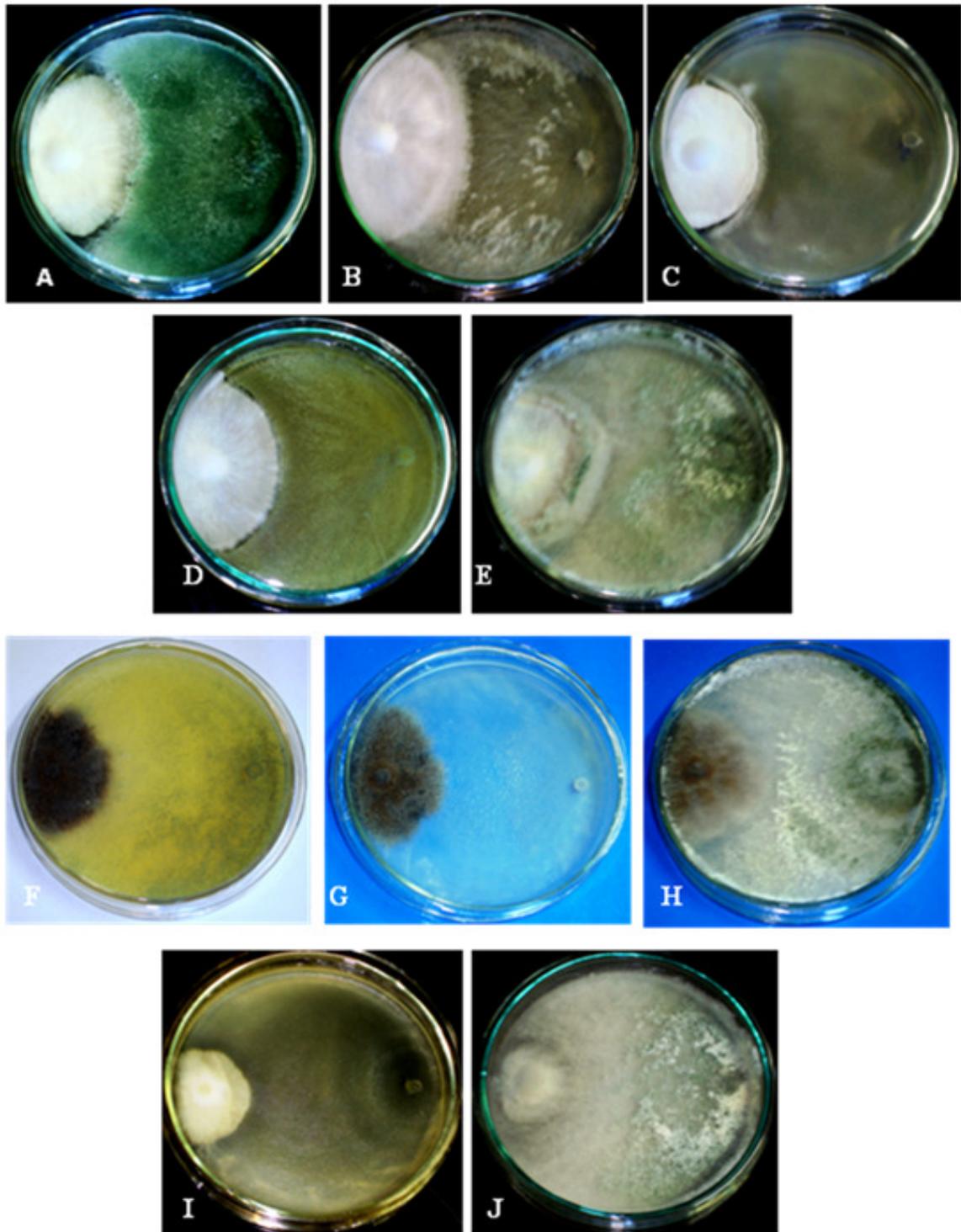


Figura 1 - Potencial antagonístico *in vitro* de *Trichoderma* spp a patógenos do cacauero na Bahia. *Moniliophthora perniciosa* - Impasse: A - *Trichoderma longibrachyatum* (4088), B - *Trichoderma viride* (905), C - *Trichoderma harzianum* (889), D - *Trichoderma pseudokonigii* (909); Sobreposição total e rápida: E - *Trichoderma pseudokonigii* (909). *Ceratocystis cacofunesta* - Sobreposição marginal: F - *Trichoderma pseudokonigii* (909); Sobreposição parcial: G - *Trichoderma pseudokonigii* (854); Sobreposição total e rápida: H - *Trichoderma pseudokonigii* (1052). *Phytophthora palmivora* - Sobreposição parcial: I - *Trichoderma harzianum* (889); Sobreposição total e rápida: J - *Trichoderma pseudokonigii* (1052).

Tabela 1 - Efeito antagônico dos isolados de *Trichoderma* spp. em relação aos isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*, *Moniliophthora perniciosa* e *Phytophthora palmivora*

Antagonistas	Patógenos		
	<i>C. cacaofunesta</i>	<i>M. perniciosa</i>	<i>P. palmivora</i>
<i>T. harzianum</i> (889)	1	0	2
<i>T. harzianum</i> (910)	3	3	3
<i>T. longibrachyatum</i> (4088)	3	0	3
<i>T. pseudokoningii</i> (854)	2	0	2
<i>T. pseudokoningii</i> (909)	1	0	3
<i>T. pseudokoningii</i> (1052)	3	3	3
<i>T. koningiopsis</i> (4090)	3	1	3
<i>T. stromaticum</i> (3550)	1	3	3
<i>T. viride</i> (905)	3	0	3

Escala de notas: 0 = Impasse; 1 = Sobreposição marginal; 2 = Sobreposição parcial; 3 = Sobreposição total e rápida.

Os isolados de antagonistas sobrepueram rapidamente às colônias de *P. palmivora* e tiveram a nota 3, com exceção de *T. pseudokoningii* (854) e *T. harzianum* (889) que sobrepueram parcialmente e tiveram a nota 2 (Tabela 1 e Figura 1), sendo portanto, *P. palmivora* o mais suscetível dos patógenos testados às espécies de *Trichoderma* utilizadas.

Vaz et al. (2012) utilizaram 39 espécies de *Trichoderma*, sendo 37 provenientes da mesma Micoteca do presente trabalho. De todos os isolados pareados com *P. palmivora*, somente 13 foram selecionados para teste *in vivo* como potenciais biocontroladores, dentre eles *T. viride* (905) e *T. harzianum* (889), que neste estudo apresentaram nota 3 e 2 da escala de avaliação, respectivamente.

No pareamento com *M. perniciosa*, cinco isolados de *Trichoderma*: *T. harzianum* (889), *T. longibrachyatum* (4088), *T. pseudokoningii* (854), *T. pseudokoningii* (909) e *T. viride* (905) se destacaram, por apresentarem impasse, recebendo a nota 0 (Figura 1). Os isolados *T. harzianum* (910), *T. pseudokoningii* (1052) e *T. stromaticum* (3550) apresentaram bom potencial antagônico e receberam a nota 3 (Figura 1), enquanto o *T. koningiopsis* (4090) recebeu a nota 1 (Tabela 1).

O potencial antagônico *in vitro* de *T. stromaticum* (3550) sobre *M. perniciosa* neste estudo corrobora com os resultados de Costa et al. (1998); Bastos (2000) e Costa et al. (2000) onde foram observadas redução na formação de basidiomas em vassouras deixadas tanto

na copa quanto na serapilheira dos cacauzeiros quando feita pulverizações com *T. stromaticum*. No entanto, quando pareado com o *C. cacaofunesta*, o *T. stromaticum* não se mostrou tão eficiente recebendo a nota 1.

Os isolados *T. harzianum* (910) e *T. pseudokoningii* (1052) mostram *in vitro* potencial de atividade antagônica sobre os patógenos do cacauzeiro *M. perniciosa*, *P. palmivora* e *C. cacaofunesta*, apresentando a nota máxima 3 nos dois ensaios e podem ser recomendados como promissores agentes de biocontrole em campo.

## Literatura Citada

- BASTOS, C. N. 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. nov. na produção de basidiomas e infecções de ramos e almofadas florais do cacauzeiro por *Crinipellis perniciosa*. *Agrotrópica* (Brasil)12:59-62.
- BETTIOL, W. et al. 2008. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: Alves, S. B.; Lopes, R. B. Controle microbiano de pragas na América Latina - Avanços e desafios. Piracicaba, ESALQ. pp. 303-331.
- COSTA, J. C. B. et al. 2000. Ação antagonista de *Trichoderma stromaticum* sobre a produção de basidiomas de *Crinipellis perniciosa* no estado da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 25 (Supl):366.
- COSTA, J. C. B. et al. 1998. Ação antagonista de *Trichoderma* sp. sobre a produção de *Crinipellis perniciosa* no estado da Bahia. In: Simpósio de Controle Biológico, 6. Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro. 89p
- 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.
- MELO, I. S. 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. Controle biológico. Jaguariúna, SP, EMBRAPA. V. 1. 52p.
- MELO, I. S. 1991. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, CNPMA/EMBRAPA. pp. 135-156.
- POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. 2009. Controle Biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão Empresarial. In: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. Biocontrole de plantas e doenças: uso e perspectiva. Jaguariúna, SP, EMBRAPA MEIO AMBIENTE. pp. 239-244.
- VAZ, A. B. et al. 2012. Seleção *in vitro* de fungos antagônicos a *Phytophthora palmivora* da pupunheira. *Agrotrópica* (Brasil) 24(3):157-168. ●