



VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO
X CONGRESSO BRASILEIRO
V SEMINÁRIO DO DF E ENTORNO
12-15 SETEMBRO 2017
BRASÍLIA- DF, BRASIL

Tema Gerador 9

Manejo de Agroecossistemas
e Agricultura Orgânica



Antagonismo in vitro de *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma harzianum* a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

*Antagonism in vitro of *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma harzianum* to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense*

MENDES, Hellenn Thallyta Alves e¹; NOLASCO, Danielle Suene de Jesus¹; COUTRIM, Ranyelly Leão¹; ANJOS, Danilo Nogueira dos², BARROS, Beatriz Lima¹; SÃO JOSE, Abel Rebouças¹

¹Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, nyellycoutrim@gmail.com; helen.talyta@hotmail.com; danielle_suene@hotmail.com; bbarrosagro@gmail.com; abelsj³@gmail.com ²Instituto Federal do Mato Grosso, danilo.anjos@cfs.ifmt.edu.br

Tema Gerador: Manejo de Agroecossistemas e Agricultura Orgânica

Resumo

Fungos do gênero *Trichoderma* representam os principais agentes de biocontrole de fitopatógenos utilizados na agricultura. Tendo em vista as propriedades inibitórias do *Trichoderma* sobre o desenvolvimento de fungos, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antagonística *in vitro*, de *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma harzianum* ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do mal do Panamá. Para o ensaio *in vitro* foi empregado o método de cultura pareada onde uma placa de Petri com meio BDA recebeu em um dos lados um disco contendo o fitopatógeno e no outro um disco do antagonista, sendo avaliados durante sete dias. Observou-se que o *T. longibrachiatum* e *T. harzianum* apresentaram ação antagônica sobre o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Palavras-chave: Controle biológico; Musa sp.; potencial antagônico.

Abstract

Fungi of the genus *Trichoderma* represent the main biocontrol agents of phytopathogens used in agriculture. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* antagonistic activity of *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma harzianum* to the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causal agent of the evil of Panama. For the *in vitro* assay the paired culture method was used where a Petri dish with BDA medium received on one side a disk containing the phytopathogen and on the other a disk of the antagonist, being evaluated for seven days. It was observed that *T. longibrachiatum* and *T. harzianum* presented antagonistic action on the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Keywords: Biological control; Musa sp.; Potential antagonistic.

Introdução

A cultura da banana (*Musa* spp.) é afetada por diversas doenças de importância econômica, dentre elas, estão aquelas causadas por fungos que atacam as plantas a partir do sistema radicular, destacando-se a fusariose causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.



VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO
X CONGRESSO BRASILEIRO
V SEMINÁRIO DO DF E ENTORNO
12-15 SETEMBRO 2017
BRASÍLIA- DF, BRASIL

Tema Gerador 9

Manejo de Agroecossistemas
e Agricultura Orgânica



As exigências dos consumidores por produtos mais saudáveis é fato cada vez mais evidente na sociedade. Os agrotóxicos nem sempre apresentam Resultados satisfatórios e duradouros, intensificando a busca por uma agricultura mais biológica, auto-sustentável e limpa (Souza, 2013).

A utilização do controle biológico constitui uma estratégia de grande interesse e importância para a redução ou substituição do uso de defensivos. Entre os promissores agentes de biocontrole estão aqueles pertencentes ao gênero *Trichoderma*, que é representado por fungos não patogênicos, que habitam o solo ou encontram-se como endofíticos em plantas e exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo e/ou antibiose (Krugner e Bacchi, 1995), são facilmente isolados, cultivados e multiplicados e colonizam com eficiência o sistema radicular de diversas plantas.

O método de pareamento de culturas fúngicas é o mais largamente utilizado em estudos de antagonismo *in vitro*, existindo numerosos relatos de sucesso na seleção de microrganismos, visando ao controle biológico de fitopatógenos. E ainda o teste *in vitro* tem a possibilidade de avaliar um grande número de isolados antagonistas (Mariano, 1993).

Tendo em vista as propriedades inibitórias do gênero *Trichoderma* sobre o desenvolvimento de fungos, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antagonista *in vitro*, de *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma harzianum* ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, agente causal do mal do Panamá.

Material e Métodos

O estudo foi realizado na Biofábrica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Vitória da Conquista – Bahia.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos (*Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* e Testemunha) e cinco repetições, sendo cada repetição composta por 3 placas de Petri, avaliados durante sete dias. O fungo *F. oxysporum* f. sp. *ubense* foi obtido de isolados caracterizado molecularmente como foc 1, da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

O *T. longibrachiatum*, de nome comercial Trichonemate e *T. harzianum* (Tricobio), ambos com concentração mínima de 2×10^8 conídios/mL, foram provenientes da Empresa Biofungi – Indústria e Comércio de Defensivos Biológicos e Inoculantes.

Para o ensaio *in vitro* foi empregado o método de cultura pareada em disco de ágar. Cada placa de Petri de 90 mm, contendo o meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar), recebeu em um dos lados, um disco de 9 mm de cultura do fitopatógeno e no outro, um disco de cultura do antagonista, ambos a 0,5 cm de distância da borda da



placa, em posições opostas. Os discos foram obtidos de culturas puras dos antagonistas e fitopatógeno, e mantidos em cultivo por sete dias. Como testemunhas, usou-se o patógeno e os antagonistas cultivados isoladamente, colocando-se um disco de micélio no centro de cada placa. As placas foram mantidas a 25°C e fotoperíodo de 12h. O potencial de antagonismo dos isolados foi avaliado em intervalos de 24 horas, até o 7º dia após a inoculação, através de medições do crescimento micelial das colônias de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi aplicada a fórmula proposta por Menten et al. (1976), na qual:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{crtest} - \text{crtrat})}{\text{crtest}} \times 100$$

Onde: crtest = crescimento radial da testemunha;

crtrat = crescimento radial do tratamento.

Para a validação do teste, foram adotadas duas escalas de notas: uma seguindo a escala de Bell et al. (1982) que baseia-se na observação visual, atribuindo notas de 1 a 5, onde 1 – O agente de biocontrole cresce completamente sobre o patógeno cobrindo a superfície total do meio de cultura; 2 – O agente de biocontrole cresce sobre no mínimo 2/3 da superfície do meio de cultura; 3 – O agente de biocontrole e o patógeno colonizam aproximadamente metade da superfície do meio de cultura (mais do que 1/3 e menos que 2/3) e nenhum deles aparece dominando o outro; 4 – O patógeno coloniza no mínimo 2/3 da superfície do meio de cultura e aparece resistindo ao agente de biocontrole; 5 – O patógeno cresce completamente sobre o agente de biocontrole e ocupa a superfície total do meio de cultura. E outra seguindo a escala de Rodrigues (2010), que atribui notas variando de 1 a 7, onde 1 - Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno; 2 - Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não sobrepõe-se sobre o disco do patógeno; 3 – Antagonista cresce sobre 3/4 da placa; 4 – Antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 5 – Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa; 6 – Patógeno cresce sobre 2/3 da placa; 7 – Patógeno cresce por toda a placa de Petri., Foi utilizado um gabarito sob o fundo da placa no momento da avaliação, em que era possível visualizar as notas conforme crescimento das colônias.



Resultados e Discussão

Os Resultados demonstraram que o *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma harzianum* apresentam ações antagônicas sobre o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, diferindo estatisticamente da testemunha (Tabela 1). A partir do quarto dia de avaliação, já é possível observar que o crescimento do *F. oxysporum* f. sp. *cubense* estabilizou quando submetido aos tratamentos.

Tabela 1. Crescimento micelial (CFUS) do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* até o 7º dia de avaliação e porcentagem de inibição (%INB) ao 7º dia, em cultivo pareado *in vitro*, com *Trichoderma* spp.

TRATAMENTOS	CFUS1	CFUS2	CFUS3	CFUS 4	CFUS 5	CFUS6	CFUS7	%INB7
<i>T. longibrachiatum</i>	1,85 b	2,16 b	2,20 b	2,59 b	2,59 b	2,59 c	2,59 a	71,17 a
<i>T. harzianum</i>	1,91 b	2,28 b	2,33 b	2,72 b	2,72 b	2,72 b	2,72 b	69,74 b
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	2,06 a	3,81 a	5,47 a	6,27 a	8,28 a	8,47 a	9,00 c	--
CV (%)	3,16	5,67	5,83	3,72	5,91	1,38	1,33	1,50

Verificou-se que o *T. longibrachiatum* apresentou maior potencial de inibição do *Fusarium* quando comparado ao *T. harzianum*, inibindo 71,17% e 69,74% o crescimento da colônia do *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, respectivamente, como apresentado na Tabela 1. Bonfim et al. (2010) observaram uma rápida ação antagônica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizopus stolonifer*, com inibição do crescimento micelial do patógeno em 72 horas de confronto. De acordo com os autores, essa inibição do patógeno, na presença de *Trichoderma* spp., pode estar associada à liberação de metabólitos pelo antagonista. Neste trabalho, não foi observada a formação de halo de inibição para o confronto com o *T. longibrachiatum* e *T. harzianum*, entretanto se constatou uma competição entre os microrganismos por substrato, em que o antagonista foi favorecido pelo seu crescimento mais rápido. Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados por Matos et al. (2016), que observaram que os percentuais de inibição de crescimento micelial de *Phytophthora* sp., se mantiveram acima de 70% quando confrontados com *Trichoderma* spp. *in vitro*. Assim, os Resultados demonstraram que houve efeito promissor dos isolados de *T. longibrachiatum* e *T. harzianum* sobre crescimento do *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Segundo a escala de Bell et al.(1982) e de Rodrigues (2010), os tratamentos testados apresentaram eficiência no controle do patógeno, diferindo estatisticamente da testemunha (Tabela 2). As duas escalas testadas também não apresentaram diferença es-



estatística entre si, podendo ser utilizadas no teste de confrontação direta de isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. A escala de Bell et al. (1982) apresentou coeficiente de variação menor do que a escala de Rodrigues (2010). Matos et al. (2016) também encontraram Resultados semelhantes ao estudar o biocontrole de *Phytophthora* sp. por isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*, com notas variando entre 1,25 a 2,09 pela escala de Bell et al. (1982).

Tabela 2. Médias das notas do teste de confrontação direta obtidas pelos isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* utilizando a escala de Bell et al. e Rodrigues ao 7º dia de avaliação.

Tratamentos	Bell	Rodrigues
<i>T. longibrachiatum</i> x <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	2,00 a	1,00 a
<i>T. harzianum</i> x <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	2,00 a	1,00 a
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	5,00 b	7,00 b
CV(%)	2,67	8,93

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Conclusão

Conclui-se com este trabalho que os *Trichoderma longibrachiatum* e *T. harzianum* são capazes de controlar com eficiência o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, fungo causador do mal-do-Panamá, em cultivo pareado *in vitro*, demonstrando grande potencial para o controle biológico.

Referências

- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, Cornell, v.72, n.4, p.379-382, 1982.
- BONFIM, M.P. SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.A.; SOUZA, I. V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.36, n.1, p.61-67, 2010.
- KRUGNER, TL.; BACCHI, LMA. 1995. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H AMORIN, L (Eds). Manual de Fitopatologia. Volume I. Princípios e Conceitos. São Paulo, SP. p. 46-95.



VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO
X CONGRESSO BRASILEIRO
V SEMINÁRIO DO DF e ENTORNO
12-15 SETEMBRO 2017
BRASÍLIA- DF, BRASIL

Tema Gerador 9

Manejo de Agroecossistemas
e Agricultura Orgânica



MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 1, p. 369–409, 1993.

MATOS, D. L.; ALVES, C. F.; FELITO, R. A.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M. Biocontrole de *Phytophthora* sp. por isolados de *Trichoderma* spp. in vitro. Agroecol 2016.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Gold. “in vitro”. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.1, p.57-66, 1976.

RODRIGUES, J. *Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*. 2010. 84 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

SOUZA, J. R. Potencialidade de fungicida e agente biológico no controle de requeima do tomateiro. 2013. 63p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Agronomia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2013.