

Controle *in vitro* de *Alternaria solani* por diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Márcia de Holanda Nozaki^{1*}; Camila Hendges²; Gustavo Henrique Ensina³; Luan Lui³;
Cleide Viviane Buzanello Martins⁴; José Renato Stangarlin⁵

¹Professora Doutora do curso de Agronomia da PUCPR, campus Toledo e pós-doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, UNIOESTE, campus Toledo – PR.

²Mestranda do programa de pós-graduação em Agronomia UNIOESTE, campus Marechal Cândido Rondon, PR.

³Graduandos em Agronomia, PUCPR, campus Toledo, PR.

⁴Professora pós-doutora do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, UNIOESTE, Toledo – PR.

⁵ Professor doutor de graduação e pós-graduação em Agronomia da UNIOESTE, campus Marechal Cândido Rondon – PR.

*marcia.nozaki@pucpr.br

Resumo: A pinta preta (*Alternaria solani*), é uma das mais importantes e frequentes doenças da cultura do tomate no Brasil, apresentando alto potencial destrutivo, incidindo sobre diferentes partes da planta, ocasionando elevados prejuízos econômicos. Como alternativa tem-se o biocontrole obtido através de diferentes tipos de interação entre os microrganismos. Neste sentido, linhagens de *Trichoderma* possuem ação contra fitopatógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a relação antagônica *in vitro* de linhagens de *Trichoderma* em relação ao isolado de *Alternaria solani*. O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de fitopatologia da PUCPR, campus Toledo-PR. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 8 tratamentos compostos pelas diferentes linhagens de *Trichoderma*, sendo: T1 - TH1; T2 - TV1; T3 - TM4; T4 - TNH2; T5 - TI2; T6 - TLB6; T7 - TLB17 e T8 - TOD2B, com 4 repetições cada. Foi realizado o teste de pareamento de culturas e após 7 dias de incubação, foram determinados porcentagem (%) de inibição, além da avaliação de crescimento da colônia, por escala de notas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010). Os dados foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 1% de significância. Pode-se verificar diferença significativa entre os tratamentos, ao considerar ambas escalas, em que o isolado T7 apresentou maior nota, consequentemente menor porcentagem de inibição da colônia de *A. solani*. Conclui-se que, que os isolados de maior destaque no biocontrole *in vitro* do fitopatógeno em questão são TH1, TV1, TI2 e TOD2B, apresentando as maiores porcentagens de controle da colônia.

Palavras-chaves: Pinta preta; *Lycopersicon esculentum* Mill.; pareamento de culturas; biocontrole.

In vitro control of *Alternaria solani* by different *Trichoderma* spp. isolates

Abstract: Blight (*Alternaria solani*), is one of the major and most frequent diseases in tomato culture in Brazil. The disease presents high destructive potential, present on different plant parts, causing high economic losses. As an alternative, it can be used the biocontrol obtained by different types of microorganisms interactions. In further sense, *Trichoderma* lines has action against phytopathogens. The present work had the aim to evaluate the antagonistic *in vitro* relation of *Trichoderma* lines related to *Alternaria solani* isolates. The work was developed in the phytopathology laboratory of PUCPR, Toledo campus. The experimental design adopted was entirely casualized with 8 treatments composed by the different lines of *Trichoderma*, being: T1 - TH1; T2 - TV1; T3 - TM4; T4 - TNH2; T5 - TI2; T6 - TLB6; T7 - TLB17 and T8 - TOD2B. It was made the dual culture tests and 7 days after incubation, it was determined percentage (%) of inhibition, besides colony growth, by scale of notes of Bell et al. (1982) and Rodrigues (2010). The data was submitted to Tukey Test at 1% of significance. It can be verified significative difference between treatments, considering both scales, in which T7 isolate presented higher note, consequently lower percentage of inhibition of *A. solani* colony compared to other treatments. It can be concluded that, the isolates TH1, TV1, TI2 and TOD2B presented better response for *in vitro* biocontrol of the phytopathogen studied, presenting higher percentages of colony control.

Keywords: blight, *Lycopersicon esculentum* Mill., dual cultures, biocontrol

Introdução

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é cultivado em todo o território brasileiro, abrangendo regiões com diferentes características climáticas, além de diversas

formas de sistemas de condução. Também está sujeito à ocorrência de doenças e pragas desde a semeadura até a colheita. Sendo as doenças fúngicas do tomateiro responsáveis por aumento de 30% no custo de produção atribuído ao uso de fungicidas para combate de doenças foliares (LOPES e SANTOS, 1994).

Fungos fitopatogênicos são responsáveis por enormes perdas na produtividade agrícola. *Alternaria solani* é um fungo encontrado em restos culturais de culturas como tomateiro, batata e muitas plantas daninhas podem servir de hospedeiro. No tomateiro causa uma doença conhecida como pinta preta (BALBI-PEÑA *et al.*, 2006).

A pinta preta (*Alternaria solani* Ellis & G. Martin L.R. Jones & Grout), é uma das mais importantes e frequentes doenças da cultura do tomateiro no Brasil. A doença apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos, ocasionando elevados prejuízos econômicos (VALE *et al.*, 2000).

É considerada uma doença de grande importância econômica, com relatos de 6 a 100% de danos na produção, caso não sejam adotadas medidas de controle preventivas e curativas (TOFOLI *et al.*, 2013).

Atualmente, o pequeno número de cultivares com resistência genética a essa doença, associado ao alto custo de suas sementes, determinam medidas de controle basicamente com produtos químicos para as variedades tradicionalmente cultivadas, que são suscetíveis ao patógeno (VALE *et al.*, 2000).

O controle químico de fungos fitopatógenos tem se mostrado eficiente, atendendo as expectativas do produtor, porém quando utilizada de maneira errada traz prejuízos ao ambiente devido à poluição proveniente dos resíduos, elevada toxicidade dos produtos e pressão de seleção sobre os patógenos elevando o número de esporos resistentes aos compostos químicos dos fungicidas. Louzada *et al.* (2009) afirmam que apesar dos fungicidas propiciarem obtenção de fibras alimentares em culturas de alta rentabilidade os usos do controle biológico apresentam uma gama de vantagens sobre a utilização do controle químico.

O biocontrole utiliza microrganismos como bactérias, actinomicetos e fungos. Este método de controle de doenças de plantas pode ser obtido por meio de diferentes tipos de interação entre os microrganismos, como o parasitismo, antibiose, competição, entre outros (PAL e GARDENER, 2006).

Segundo Köhl *et al.* (2011), o desenvolvimento de novos produtos para o controle biológico de doenças de plantas requer triagem de um número elevado de candidatos

antagonistas, precisando cumprir distintas exigências além do controle do fitopatógeno, tais como, serem seguros, de baixo custo e apresentar amplo mercado consumidor.

Dessa forma, o controle biológico vem sendo estudado para servir como uma alternativa. Dentre os antagonistas utilizados no biocontrole de fungos fitopatogênicos, cerca de 90% têm sido reali-zados com diferentes isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma* (BENÍTEZ *et al.*, 2004; KUNIEDA-ALONSO *et al.*, 2005).

Trichoderma spp. são fungos de vida livre, com reprodução assexuada podendo ser encontrados mais facilmente em solos de regiões que apresentam clima temperado e tropical (MACHADO *et al.* 2012). Espécies do gênero *Trichoderma* inclui um vasto número de espécies com importância econômica baseada no seu potencial de controle biológico, sendo comercializado como biopesticida. Biofertilizantes (ALVARADO-MARCHENA, RIVERA-MÉNDEZ; 2016).

Algumas linhagens de *Trichoderma* possuem ação contra fitopatógenos e promovem crescimento vegetal devido a suas características como parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência (MACHADO *et al.* 2012). Ou seja, são capazes de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e produzem também substâncias antifúngicas (antibióticos), apresentam diversidade de estratégias de sobrevivência que as tornam altamente competitivas no ambiente e extraordinária capacidade de proliferação na rizosfera (MELO, 1996; REZENDE *et al.* 2004).

A formação de coleções de culturas microbianas é fundamental para o desenvolvimento de programas de controle biológico, uma vez que elas oferecem estoque representativo de amostras de isolados e oportunidade de gerar informações economicamente importantes para a seleção e utilização desses microrganismos (MELLO, 2008).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a relação antagônica *in vitro* de linhagens do fungo *Trichoderma* em relação ao isolado de *Alternaria solani*.

Material e métodos

O estudo foi desenvolvido no laboratório de fitopatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, campus Toledo-PR. Com exceção dos isolados de *Trichoderma* designados TH1 e TV1, e do isolado de *Alternaria solani*, os demais isolados de *Trichoderma* foram cedidos pela micoteca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, câmpus Marechal Cândido Rondon e mantidos em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA). O isolado de

Alternaria solani foi obtido do isolamento direto de tecidos sintomáticos de folhas de tomateiro e mantidos em meio V8. Enquanto que, os isolados TH1 e TV1 foram obtidos do isolamento direto de amostras de solo coletados na região de Toledo-PR.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 8 tratamentos e quatro repetições cada. Os tratamentos foram compostos pelas diferentes linhagens de *Trichoderma*, procedente de diferentes origens, sendo: T1 - *T. harzianum* (TH1); T2 - *T. viride* (TV1); T3 - *T. virens* (TM4); T4 - *T. virens* (TNH2); T5 - *T. harzianum* (TI2); T6 - *T. asperellum* (TLB6); T7 - *T. koningiopsis* (TLB17) e T8 - *T. longibrachiatum* (TOD2B).

Foi realizado o teste de pareamento de culturas em que, após o preparo dos meios BDA, foram depositados em cada extremidade da placa contendo meio, um disco micelial do patógeno *Alternaria solani* e outro do antagonista *Trichoderma* sp. localizado aproximadamente a 1cm da borda da placa.

As placas foram vedadas e mantidas em estufa incubadora para BOD com fotoperíodo 12/12h e temperatura de 25°C por um período de sete dias. Ao término deste período, realizou-se medições do diâmetro das colônias com auxílio de um paquímetro analógico sendo assim determinado o tamanho do halo de inibição (cm) entre o micélio de *A. solani* e *Trichoderma* aos sete dias de incubação para determinação de porcentagem (%) de inibição de *Alternaria solani*.

Além da avaliação de crescimento da colônia, as mesmas foram avaliadas visualmente para determinação da nota de acordo com a escala proposta por Bell et al. (1982), sendo: nota 1 - *Trichoderma* ultrapassou completamente o patógeno e cobriu toda a superfície média; nota 2 - *Trichoderma* ultrapassou pelo menos 2/3 da superfície.

Outra escala utilizada para avaliação foi a adaptada de Rodrigues (2010), baseada em um gabarito que é posicionado sob as placas, cujas notas variam de 1 a 7, na qual 1 o antagonista cresce e ocupa toda a placa e 7 o patógeno cresce e ocupa toda a placa. O uso da escala de Rodrigues visa uma maior confiabilidade na obtenção das notas, além de uma maior amplitude na escala de valores, já que se baseia em um gabarito fixo.

Os dados das avaliações, com exceção da porcentagem, foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância, com auxílio do programa estatístico SASM – Agri versão 2.8. (CANTERI et al., 2001).

Resultados e discussão

Pelos dados expostos na Tabela 1, pode-se verificar que houve diferença significativa entre os tratamentos, tanto ao considerar a escala de notas de Bell *et al.* (1982), quanto a escala de Rodrigues (2010), em que o isolado T7 apresentou maior nota, consequentemente menor porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria solani* (33,3%), em relação aos demais tratamentos.

É possível notar que na escala de Bell, o isolado diferencia-se significativamente dos demais. Entretanto, ao considerar a escala de Rodrigues, embora também tenha apresentado diferença estatística significativa, há isolados considerados intermediários na escala, enquanto os isolados TH1, TV1, TI2, TLB6, TOD2B se destacam com as menores notas.

Tabela 1 - Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo a *Alternaria solani* segundo as escalas de Bell (1982) e Rodrigues (2010) e porcentagem de inibição de crescimento (%) de *Alternaria solani*. Toledo, PR, 2018.

Tratamentos	Escala de Bell	Escala de Rodrigues	% de inibição A. <i>solani</i>
T1- <i>T. harzianum</i> (TH1)	1,50 b	1,50 c	66,11
T2- <i>T. viride</i> (TV1)	1,50 b	1,50 c	63,33
T3- <i>T. virens</i> (TM4)	2,00 b	3,00 b	68,06
T4- <i>T. virens</i> (TNH2)	1,75 b	2,00 bc	65,56
T5- <i>T. harzianum</i> (TI2)	1,50 b	1,50 c	68,33
T6 - <i>T. asperellum</i> (TLB6)	1,00 b	1,00 c	100
T7 – <i>T. koningiopsis</i> (TLB17)	4,00 a	5,00 a	33,3
T8 – <i>T.longibrachiatum</i> (TOD2B)	1,00 b	1,00 c	100
F	3,49**		-
CV(%)	38,01	26,18	-

**Médias seguidas de letras iguais não se diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de significância.

Ethur (2006) observou que a seleção de isolados de *Trichoderma* spp. pela técnica de confrontação direta, pode classificar como “eficientes” aqueles que apresentam notas de 2,0 a 2,5 e “muito eficientes” aqueles com notas de 1,0 a 1,5. No presente trabalho, os isolados TH1, TV1, TI2 e TOD2B obtiveram notas variando de 1,0 a 1,5, sendo, portanto, considerados muito eficientes no controle do fitopatógeno em questão.

Bomfim *et al.* (2010) descrevem que as menores ações antagônicas em alguns tratamentos podem estar relacionadas a competição por nutrientes do meio ou menor produção de enzimas (protease e cisteína) por parte do *Trichoderma* que tem como objetivo inativar a capacidade enzimática do fitopatógeno.

Machado e Silva (2013) descrevem que os mecanismos de ação se devem a características específicas das cepas, sendo possivelmente o fator que explica as diferenças no desempenho de cada isolado do presente trabalho.

No presente trabalho, dos 8 isolados testados, apenas 1 apresentou taxa de controle menor que 50%. E, destes, considerando a escala de Rodrigues, 4 deles apresentaram-se muito eficientes no controle do fitopatógeno, apresentando ação antagônica muito agressiva. Resultados estes que se assemelham aos obtidos por Hoffmann *et al.* (2015) que ao testarem o antagonismo de 15 isolados de *Trichoderma* em relação ao *Fusarium*, verificaram que 12 deles apresentaram uma ação antagônica muito agressiva, impedindo o desenvolvimento do patógeno.

Essa variabilidade na ação dos antagonistas pode estar relacionada à produção dos metabólitos. Segundo Harman (2000), muitas espécies estudadas produzem metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. De acordo com este autor, duas linhagens de *T. harzianum* (T39 e NCIM1185) produzem uma protease que é capaz de degradar enzimas sintetizadas pelo patógeno *Botrytis cinerea*, por exemplo, demonstrando especificidade entre alguns isolados e o patógeno.

Bonett *et al.* (2013) verificaram que isolados de *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride* e *T. virens* foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* se caracterizando como tratamentos similares.

Machado e Silva (2013) verificaram eficiência de isolados de *T. harzianum* somente no antagonismo com *Alternaria* sp. e *Cladosporium* sp. não apresentando esse efeito contra *Phoma* sp. e *Bipolaris* sp. Silva *et al.* (2008) observaram que *Trichoderma* spp. foram eficientes em inibir o desenvolvimento micelial de *Phytophthora* e o isolado que apresentou menor antagonismo foi de *T. harzianum*. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho se diferenciam dos obtidos por Silva *et al.* (2008), visto que o melhor tratamento foi com o uso do antagonista *T. harzianum* TI2.

As duas escalas podem ser utilizadas no teste de confrontação direta de isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Alternaria solani*. A escala de Rodrigues (2010) é mais precisa que a escala de Bell *et al.* (1982) uma vez que neste ensaio apresentou coeficiente de variação mais baixo.

Conclusão

Quando da adoção de controle alternativo do fungo *Alternaria solani*, o uso dos isolados TH1, TV1, TI2 e TOD2B apresentaram maior porcentual de inibição, apresentando assim, viabilidade de aplicação prática futura.

Agradecimentos

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná por disponibilizar material e espaço físico para o desenvolvimento do trabalho. E à Unioeste, câmpus Marechal Cândido Rondon (PR), em especial ao Prof. José Renato Stangarlin por ceder parte dos isolados utilizados no trabalho e ao câmpus Toledo (PR), em especial ao programa de Ciências Ambientais pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho como parte do estágio pós-doutoral da autora principal.

Referências

- BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e Curcumina – II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**. v.31, n. 4, jul-agosto. 2006.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n.4, p.379 – 382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. (2004) - Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, 7, 4: 249-260.
- BOMFIM, M. P. et al. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa phytopathologica**. Botucatu, v.36, n.1, jan./mar. 2010.
- BONNET, L. P. et al. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra agente causal da antracnose em feijoeiro comum. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia.**, v.8, n.4, p.27-35, jan./abr. 2013.
- ETHUR, L.Z. (2006). Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro. **Dissertação de Doutoramento**. Universidade Federal de Santa Maria, Brasil. 155 p.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. (2004a) - *Trichoderma* species – Oppor-tunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, 2, 1: 43–56.
- HOFFMANN, C. A. et al. Potencial de antagonism de isolados de *Trichoderma* sp. contra isolados de *Fusarium* sp., *in vitro*. **Revista Verde.**, Pombal, v.10, n.1, p. 236- 242, jan-mar., 2015.
- KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCHI, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacterial. **Biological Control**, Lexington, v. 57, p. 1-12, 2011.
- KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A. (2005) - Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. **Fitopatologia Brasileira**, 30, 2: 164-168.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro.** Brasília: CNPH EMBRAPA, 1994. 67p.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias.** v.35, n.1, p.274-288, jan-jun. 2012.

MACHADO, D. F. M.; SILVA, A. C. F. *Trichoderma* no controlo *in vitro* de fungos presentes em diásporos de *Gochnatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias.**, Lisboa, v.36, n.2, 2013.

MARCHENA-ALVARADO, L.; RIVERA-MÉNDEZ, W. Molecular identification of *Trichoderma* spp. in Garlic and Onion fields and *in vitro* Antagonism Trials on *Sclerotium cepivorum*. **Revista Brasileira de Ciências do Solo.**, Viçosa, v. 40, abr. 2016.

MELLO, S.C.M. 2008. Recursos genéticos de microrganismos. In: **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucional e políticas.** v. 2. (A.C.S. ALBUQUERQUE & A.G. SILVA). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 700p.

MELO, I.S. 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revis. Anu. Patol. Plantas** 4(1):261-295.

PAL, K. K.; GARDENER, M. C. S. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, Ithaca, v. 1, p. 1-15, 2006.

RESENDE, M.L.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VON, R.G.P.; VIEIRA, A.R. 2004. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agro tecnologia** 28(4):793-798.

SILVA, K.S. et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, out./nov. de 2008.

TÖFOLI, J. G.; MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. Requeima e pinta preta na cultura da batata: importância, características e manejo sustentável. **Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2013

VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L., PAUL, P.A.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos em tomate. In: Zambolim, L., Vale, F.X.R. & Costa, H. (Eds.) **Controle de Doenças de Plantas: Hortaliças**. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000. pp. 699-756.