



## Antagonismo *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. contra o fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa do cupuaçuzeiro

ARAÚJO, Rosiere Fonteles<sup>1</sup>; LIMA-PRIMO, Hyanameyka Evangelista<sup>2</sup>, SOUZA, Giovanni Ribeiro<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de agronomia, Bolsista PIBIC/CNPq, UFRR, CEP: 69300-000 Boa Vista, RR.

<sup>2</sup>Embrapa Roraima, CEP: 69301-970, Boa Vista, RR.

rose.bine@hotmail.com

Palavras Chave: *Theobroma grandiflorum*, Bioensaio, Controle biológico, Potencial Antagônico.

### INTRODUÇÃO

A vassoura de bruxa é a doença de maior importância na cultura do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) na Região Amazônica, causada pelo fungo badiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer (Meinhardt et al., 2008), que infecta principalmente tecidos novos nas regiões meristemáticas das plantas, lançamento e almofadas florais, ocasionando queda acentuada na produção, provocando sintomas característicos de desequilíbrio hormonal que ocasionam interações patógeno-hospedeiro (Alves et al., 2006) e enfraquecimento geral da planta. Dependendo das condições climáticas e da disponibilidade do inóculo no plantio, seja qual for o tecido meristemático da planta, ele poderá ser infectado. A gravidade da doença aumenta conforme o início da produção, quando a planta cresce, tendo um maior volume de copa, e dessa forma maior número de gemas em desenvolvimento.

Perdas significativas da produção de cupuaçu vêm sendo registrado no estado de Roraima, grande parte dos plantios de cupuaçuzeiro encontra-se seriamente prejudicado, alguns em estado de abandono, pois utilizaram materiais suscetíveis a essa doença (Lima et al., 2013). Várias técnicas vêm sendo utilizada de forma integrada para o controle dessa doença, como poda fitossanitária, a utilização de genótipos de cupuaçu resistente e o uso de defensivos químicos.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a agricultura, pois possuem amplas possibilidades para aplicação, tanto no biocontrole de patógenos foliares, quanto no de patógenos radiculares, podendo atuar também como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (MOHAMED e HAGGAG, 2006). Diversos mecanismos podem estar abrangendo o modo de ação antagonista de fungos do gênero *Trichoderma* (BENHAMOU e CHET, 1996). Wells et al., (1972), observaram ainda que espécies de *Trichoderma* podem ser diferencialmente seletivas contra diferentes fungos.

Na literatura, observa-se que as espécies de *Trichoderma* atuam como parasitas de vários fitopatógenos, e demonstram certo grau de especialização, podendo diferenciar no nível de controle dependendo do isolado e sua adaptação às condições específicas bióticas e abióticas, intra e interespecífica nas espécies de *Trichoderma* (DENNIS; WEBSTER, 1971). Por conta disso, várias espécies do gênero *Trichoderma* têm sido estudadas e desenvolvidas como agentes antagonistas para diversos fitopatógenos (MELLO et al., 2007).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar *in vitro*, o potencial antagônico de isolado de *Trichoderma* spp., contra isolados de *M. perniciosa*.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado teste de pareamento de culturas *in vitro* entre isolados de *Moniliophthora perniciosa* x isolados de *Trichoderma* spp., no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, situada no município de Boa Vista – RR, no período de Janeiro de 2016 a maio de 2016. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 30 tratamentos e cinco repetições. Utilizaram-se cultivos individuais de *M. perniciosa*. Os bioensaios foram realizados testando-se três isolados de *Moniliophthora perniciosa* e 10 isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp., doravante designado por Tssp, pertencem à coleção de isolados da Embrapa Roraima, assim como os isolados de *M. perniciosa*, doravante designadas por Mp. A multiplicação inicial tanto dos isolados de Mp, quanto dos isolados de Tssp, foi realizada em placas contendo o meio de Batata Dextrose Ágar (BDA), acondicionadas em câmara de crescimento do tipo B.O.D. à 25 °C e com fotoperíodo de 12 horas. O meio BDA foi preparado a 20% e vertido em placas de Petri (90 mm). Para o confronto direto dos organismos, foram estabelecidas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição uma placa de Petri. As culturas pareadas do antagonista e do patógeno foram feitas transferindo-se primeiramente para uma placa de Petri (90 mm) contendo meio BDA, a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da borda, um disco de 0,5 cm de diâmetro da porção periférica de placa contendo meio BDA com micélio de Mp. As culturas foram incubadas a 24 ± 2 °C em fotoperíodo de 12 horas. No 4º dia de cultivo, com auxílio de alça cromo níquel, foi transferido para o lado oposto à colônia de Mp, um disco de 0,5 cm de diâmetro obtido da margem periférica de placa contendo meio BDA com micélio e esporos de Tssp. Posteriormente, as placas foram incubadas em B.O.D. a 24 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas, sendo o tempo de incubação dos cultivos determinado através de placas controle, até que a colônia de Mp atingisse a extremidade oposta da placa, sendo este o tempo de cultivo utilizado para os cultivos pareados.





Após seis dias de cultivo, avaliou-se o crescimento micelial dos fungos adotando a escala proposta por Bell et al. (1982), modificada. Considerou-se o isolado como antagonístico ou eficiente quando sua nota era menor ou igual a 3,0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *Trichoderma* spp, tiveram suas eficiências de crescimento micelial avaliadas para se determinar, in vitro, quais os isolados mais agressivos. Contudo, de acordo com Domingues et al., (2009), em se tratando de um bioensaio in vitro, o meio de cultura pode afetar o crescimento micelial de fungos, tanto do fitopatógeno como do antagonista, de uma forma que a resposta diferencial dos isolados à velocidade de crescimento em meio BDA pode ter ocorrido pelo fato dos microrganismos metabolizarem nutrientes com habilidades diferentes e com isto afetar a síntese de macromoléculas essenciais ao seu crescimento (GRIFFIN, 1993). Os isolados Tssp 3, Tssp 6, Tssp 7 e Tssp 8 quando confrontados com o isolado Mp 1, foram considerados eficiente quanto ao antagonismo, pois apresentando nota 3 (Tabela 1). Conforme metodologia descrita por Bell et al., (1982) considera-se o isolado como antagonístico ou eficiente quando sua nota for menor ou igual a 3,0.

**Tabela 1.** Potencial antagonístico de 10 isolados de *Trichoderma* spp. (Tssp 1 a Tssp 10) contra três isolados do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Mp 1, Mp 2 e Mp 3), agente causal da vassoura de bruxa do cupuçuazeiro, ao 6º dia de cultivo pareado.

Código de acesso dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. testados	Notas de acordo com a escala de Bell et al. (1982) atribuídas aos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao antagonismo ao 6º dia*		
	Mp 1	Mp2	Mp3
Tssp 1	3,5	2,0	5,0
Tssp 2	3,5	2,0	5,0
Tssp 3	3,0	2,0	3,5
Tssp 4	3,5	2,0	4,0
Tssp 5	3,5	2,0	4,0
Tssp 6	3,0	2,0	3,0
Tssp 7	3,0	2,5	4,5
Tssp 8	3,0	2,5	5,0
Tssp 9	3,5	2,5	5,0
Tssp 10	3,5	2,5	5,0

\*De acordo com a escala proposta por Bell et al. (1982), modificada, os isolados foram classificados como: Nota 1, crescimento de *Trichoderma* sobre o patógeno, ocupando toda a superfície do meio; Nota 1,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 7/8 da superfície do meio; Nota 2 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando mais de 2/3 da superfície do meio; Nota 2,5 – crescimento de *Trichoderma*, ocupando 5/8 da superfície do meio; Nota 3 – crescimento de *Trichoderma*, ocupando aproximadamente metade da superfície do meio; Nota 3,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 3/8 da superfície do meio; Nota 4 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 1/3 da superfície do meio e Nota 5 - ausência de crescimento de *Trichoderma*, patógeno ocupando toda a superfície do meio.

Os melhores resultados para a relação antagonista/patógeno foram obtidos pelos 10 isolados de *Trichoderma* spp., quando estes foram confrontados com o isolado Mp 2, que apresentou nota variando de 2,0 a 2,5. Para os isolados Tssp que receberam nota 2, ocorreu sobreposição parcial do patógeno pelo antagonista, indicando que os isolados de Tssp apresentam potencial antagonístico quando submetidos ao isolado Mp2. Dados obtidos por outros autores evidenciam que diversos mecanismos podem estar envolvidos na ação antagonista de fungos do gênero *Trichoderma*, tais como parasitismo direto, antibiose e competição (BENHAMOU e CHET, 1996). Por conta disso, várias espécies do gênero *Trichoderma* têm sido pesquisadas e desenvolvidas como agentes de biocontrole para diversos patógenos (MELLO et al., 2007). Entretanto, dentre os 10 isolados de *Trichoderma* spp., confrontados com o isolado Mp 3, apenas o Tssp 6 apresentou nota inferior a 3,0, sendo o restante considerados não eficientes com relação ao potencial antagonístico, pois apresentaram notas variando de 3,5 a 5. Dos 10 isolados de Tssp testados, o isolado Tssp 6 foi o único que inibiu o crescimento micelial de todos os isolados de Mp testados, pois apresentaram notas iguais ou menores que 3 no teste de pareamento de cultura. Esse potencial necessita agora ser examinado por meio de bioensaios conduzidos sob condições controladas e de campo, pois excelentes resultados com antagonistas obtidos in vitro podem não ser confirmados em condições de campo, já que esses organismos estão sujeitos às reações diferenciais do hospedeiro e do ambiente (LOUZADA et al., 2009). Os estudos sobre controle biológico avaliam isoladamente muitas características do antagonista e do patógeno. Contudo, como a seleção de um bom antagonista que reúna várias qualidades que possam atuar juntamente com a natureza (MARTINS-CORDER e MELO, 1998). Com isso, deve-se estabelecer índices que definam os isolados de *Trichoderma* spp., que possuem melhores características para o biocontrole de *M. perniciosa*.



## CONCLUSÕES

Dos 10 isolados de Tssp testados, o isolado Tssp 6 foi o único que apresentou potencial antagônico *in vitro* contra todos os isolados de Mp testados.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa PIBIC.

BENCHIMOL, R.L. **Doenças do cupuaçuzeiro causadas por fungos**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. p.50. Disponível em <<http://www.scielo.br>.

DICKSTEIN, E.R.; PURDY, L.H.; FRIAS, G.A. *Crinipellis perniciosa*, the cacao witches' broom fungus: Inoculum production and storage. *Phytopathology*, v.77, p.1747, Abstract, 1987.

LIMA, H. E.; SANTOS, V. A.; CHAGAS, E. A.; RODRIGUEZ, C. A.; ARAÚJO, M. C. R. **Severidade da vassoura de bruxa em genótipos de cupuaçuzeiro cultivados em sistemas agroflorestal (SAF's) e produção de genótipos tolerantes à doenças**. *Cadernos de Agroecologia*. v.8, n. 2, 20013. Disponível em <<http://www.aba-agroecologia.org.br>.

SOUZA, M. G.; SOUZA, A. G. C. S.; ARAÚJO, J. C. A.; SOUSA, N. R.; LIMA, R. M. B.

Método para avaliação da severidade da Vassoura-de-bruxa em cupuaçuzeiro em condições de campo. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 11p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 10.

VENTURIERI, G. A. Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do Cupu, 1993. 108p.

RESENDE, M.L.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VON, R.G.P.; VIEIRA, A.R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. *Cienc. Agrotec.*, v.28, n.4, p.793-798, 2004.

VAN EGMOND, H.P.; SCHOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.389, p.147-157, 2007.