

Avaliação de *Trichoderma viride* e formaldeído no controle da armilariose em plantios jovens de *Pinus elliottii* var. *elliottii*

Evaluation of *Trichoderma viride* and formaldehyde for control of *Armillaria* root rot in young plantings of *Pinus elliottii* var. *elliottii*

Celso Garcia Auer¹(*)
Nei Sebastião Braga Gomes²

Resumo

A armilariose é a principal doença em plantios comerciais de pínus na região Sul do Brasil. Uma das medidas de controle recomendadas é o uso de antagonistas. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de *Trichoderma viride* Pers. ex Gray sobre a incidência da doença. Um ensaio foi instalado em um plantio comercial de *Pinus elliottii* Engelm var. *elliottii*, localizado em Santa Maria do Oeste (PR). O inóculo do antagonista foi produzido em grãos de trigo esterilizados e colonizados por *T. viride*, em laboratório. Trinta dias antes da aplicação do antagonista, o solo foi desinfestado com 10 L de uma solução de formaldeído a 2%, por cova. Os grãos de trigo com *T. viride* foram aplicados na cova durante o plantio das mudas de pínus. O ensaio foi montado em parcelas com trezentas plantas com quatro tratamentos: formaldeído mais antagonista, somente formaldeído, somente antagonista e testemunha. A mortalidade de árvores foi quantificada durante 49 meses. A incidência foi menor na parcela onde se aplicou somente formaldeído (5,7 %), seguido pelos tratamentos somente antagonista (11,3 %), formaldeído mais antagonista (11,7 %) e testemunha (12,3 %).

Palavras-chave: controle biológico; podridão de raízes; pínus.

Abstract

Armillaria root rot occurs in Southern Brazil, causing death of trees in *Pinus* plantation. One of the recommended control measures is using antagonists. Thus,

1 Dr.; Engenheiro Florestal; Pesquisador Científico do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Pelotas, Professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, UFPR; Endereço: Cx. Postal, 319, CEP: 83.411-000, Colombo, Paraná, Brasil; E-mail: auer@cnpf.embrapa.br (*) Autor para correspondência.

2 Dr.; Engenheiro Florestal; Professor do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Acre, UFAC; Endereço: BR-364, km 04, CEP: 69.915-900, Rio Branco, Acre, Brasil; E-mail: neibraga@ufac.br

the objective of this work was to evaluate the effect of *Trichoderma viride* Pers. ex Gray and formaldehyde on disease incidence. The assay was performed in a commercial plantation of *Pinus elliottii* Engelm var. *elliottii* in Santa Maria do Oeste, Parana state. Inoculum of *T. viride* was produced by colonizing sterilized wheat grains in laboratory. Thirty days before antagonist application, soil disinfested was done by applying of 10 L solution of formaldehyde (2 %), per hole planting. After that, *T. viride* inoculum wa incorporated into soil during planting of pine seedling. The assay was performed in plots of 300 seedlings in four treatments: formaldehyde plus antagonist; only formaldehyde, only antagonist and control. The mortality of trees was quantified during 49 months. Incidence of dead of trees was lower in plot treated with only formaldehyde (5.7 %), followed by only antagonist (11.3 %), formaldehyde plus antagonist (11.7 %) and control (12.3 %).

Key words: biological control; pine; root rot.

Introdução

A armilariose é a principal doença em plantios comerciais de pínus no Brasil (KRUGNER; AUER, 2005). Esta doença é causada por fungos do gênero *Armillaria* (Fr.:Fr.) Staude. O controle dessa doença baseia-se principalmente na minimização da quantidade do inóculo inicial do patógeno na plantação (LONGA et al., 2009). Para isso, o preparo da área a ser reflorestada deve incluir a destoca e recolhimento dos restos de raízes e tocos da vegetação anterior, apodrecidos ou não e sua posterior queima (IVORY, 1987). Outra possibilidade de manejo da doença é a utilização de agentes de controle biológico (FOX, 2000).

Os agentes biocontroladores (antagonistas) que podem ser usados para o controle de infecções causadas por patógenos do gênero *Armillaria* podem ser tanto colonizadores de madeira ou competidores da rizosfera. Eles podem agir por inibição, prevenindo o desenvolvimento do micélio e rizomorfias do patógeno, pela limitação do substrato já ocupado, pela pré-ocupação do substrato, ou pela eliminação do patógeno (talvez por recolonização) do substrato já ocupado (HAGLE; SHAW, 1991).

O mais completo estudo de antagonistas de espécies de *Armillaria* foi feito com espécies do gênero *Trichoderma* Persoon (RAZIQ, 2000). Todavia, as tentativas para o controle de *Armillaria* pela introdução massal de *Trichoderma*, no solo implicam em um conhecimento profundo das condições ecológicas do solo para uma adequada introdução do antagonista (LONGA et al., 2009). Espécies de *Trichoderma* são satisfatoriamente resistentes aos fumigantes do solo, sugerindo o uso de inóculo natural de *Trichoderma* com doses subletais dos fumigantes para morte parcial de *Armillaria* e facilitar a ação subsequente de *Trichoderma* (HAGLE; SHAW, 1991). Um destes fumigantes é o formaldeído, o qual foi utilizado em doses subletais para o controle de *Armillaria* e outros patógenos radiculares em pomares de maçã (SANHUEZA, 1988), onde a população de *Trichoderma* é estimulada e o controle do patógeno pode ser atingido.

No Brasil, poucos estudos foram feitos sobre o controle biológico de *Armillaria* utilizando *Trichoderma*. Gomes e Auer (2003) ao avaliarem o antagonismo in vitro de *Trichoderma viride* Pers. ex Gray e *Armillaria* sp., relataram que embora *T. viride*

tenha colonizado o micélio de *Armillaria*, não houve redução significativa da biomassa seca do patógeno ao final do ensaio. Gomes (2005) ao aplicar este antagonista em uma área reflorestada com *Pinus elliottii* Engelm var. *elliottii* infestada com *Armillaria* sp. constatou uma redução do número de árvores jovens mortas na parcela tratada com *T. viride*, em relação à parcela testetemunha, contudo esta diferença não foi significativa.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de *T. viride* e de formaldeído sobre a incidência da armilariose em um plantio jovem de *P. elliottii* var. *elliotti*.

Material e Métodos

O ensaio foi instalado em um sítio florestal no município de Santa Maria do Oeste, estado do Paraná, localizado a 24°50'S e 51°57'W, com altitude de 936 m e com clima subtropical úmido – Cfa (classificação climática de Köppen-Geiger). Essa área foi anteriormente cultivada com *P. elliottii* var. *elliottii*, explorada comercialmente entre 25 a 30 anos de idade. Após o corte das árvores, fez-se a retirada das toras e a queima dos resíduos florestais, sem a destoca. A área escolhida para o ensaio foi de 6.000 m², com infestação natural de *Armillaria* sp.

Preparo do inóculo do antagonista:

O antagonista utilizado no ensaio foi o isolado T- 15 de *T. viride* gentilmente fornecido pela Embrapa Uva e Vinho. Para a produção de inóculo do antagonista, grãos de trigo foram lavados em água fria, colocados em panelas de alumínio de 5 L com água suficiente para cobrir os grãos e aquecidos até o ponto de fervura e escorridos em peneira. Posteriormente, porções de 200 g de trigo fervido foram acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno autoclaváveis, que

foram esterilizados em autoclave por uma hora a 120 °C.

Posteriormente, em cada saco contendo o substrato foram injetados, por meio de seringas estéreis descartáveis, três mL de suspensão aquosa do antagonista na concentração de 10⁶ conídios/mL. Os sacos com grãos foram colocados em prateleiras em condições de temperatura ambiente de laboratório (ao redor de 25 °C), sob luz fria contínua, até a colonização completa do substrato, período que variou entre uma a duas semanas.

Decorrido este período, o substrato colonizado pelo fungo de cada embalagem foi transferido para cartuchos de papel, com capacidade para 10 kg para secagem em câmara ventilada em temperaturas entre 30 e 40 °C, por 48 horas. Após a secagem, o conteúdo foi embalado em doses de 200 g (grãos secos) e mantido em câmara fria a 12 °C, por um período de sete dias, até a data de aplicação.

Montagem do ensaio: Para a montagem do ensaio utilizou-se a metodologia adaptada de Valdebenito-Sanhueza (1991). Nesta metodologia aplica-se, em cada cova, por meio de rega, 10 L de formaldeído (empregado como esterilizante para enfraquecer o patógeno) a 2% (0,5 L de solução de formaldeído comercial a 40% e 9,5 L de água potável), trinta dias antes da aplicação do inóculo de *T. viride*.

Os tratamentos utilizados foram: (1) somente formaldeído - aplicação da solução a 2%; (2) formaldeído e antagonista - trinta dias após a aplicação da solução de formaldeído, incorporaram-se 200 g de trigo contendo micélio e conídios de *T. viride* durante o plantio das mudas; (3) somente antagonista - trinta dias após a aplicação da solução de formaldeído nos outros

tratamentos, incorporaram-se 200 g de trigo contendo micélio e conídios de *T. viride* durante o plantio das mudas e (4) testemunha: sem aplicação de formaldeído ou antagonista. Os tratamentos foram aplicados em novembro/2003 e mudas de pínus com seis meses de idade foram plantadas em espaçamento 2 m x 2,5 m em dezembro/2003, em parcelas simples de 300 plantas para cada tratamento (1.500 m²)m espaçamento 2 m x 2,5 m.

As parcelas foram monitoradas por 49 meses, após a aplicação dos tratamentos, tendo sido avaliadas em março/2005, novembro/2005, março/2006, julho/2006, dezembro/2006, abril/2007 e janeiro/2008, fazendo-se a contagem do número de árvores mortas pela doença. A confirmação da armilariose foi dada por meio da raspagem da casca e visualização da placa micelial do fungo na entre-casca da base da árvore e nas raízes mortas. Para a comparação dos valores de incidência de árvores mortas, utilizou-se o teste t ($p < 0,05$), para calcular os intervalos de confiança para cada tratamento.

Resultados e discussão

A incidência da armilariose, expressa pelo número de árvores de pínus mortas, aumentou lentamente ao longo do tempo. Este tipo de comportamento de expansão da doença é similar para espécies florestais por *Armillaria* (BRUHN et al., 1996; GOMES, 2005; SHAW, 1980; SWIFT, 1972). Segundo Gomes (2005), pode ser considerado um aumento anual médio da doença em pínus de 1%, após avaliar plantios nos estados do Paraná e Santa Catarina. No presente estudo, considerando todos os tratamentos, a incidência anual média foi alta (2,5%) indicando uma elevada infestação do patógeno na área em estudo.

A aplicação de *T. viride* no solo de plantio de *P. elliotii* var. *elliotii* não controlou a armilariose dentro do período analisado (Figura 1), pois a doença evoluiu de modo similar nos tratamentos sem *T. viride*. A mortalidade das árvores de pínus começou a ser detectada após os seis meses de plantio, com algumas plantas mortas nas parcelas.

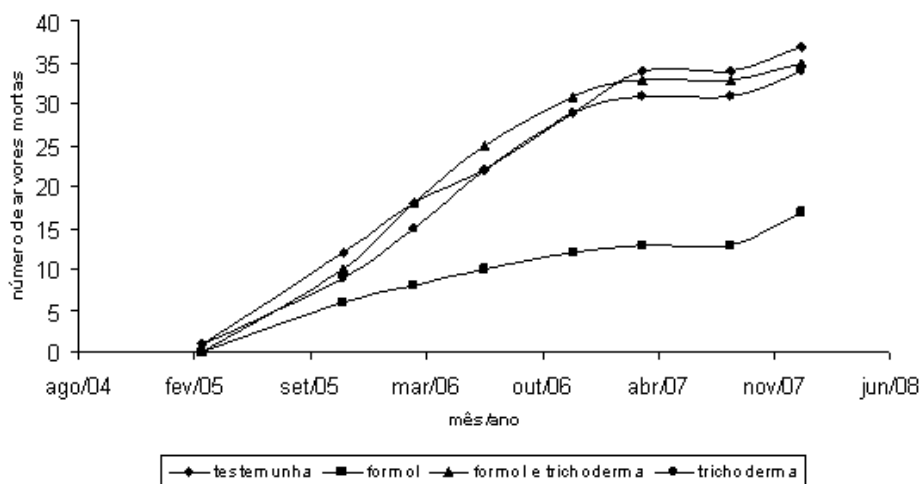


Figura 1. Evolução do número de árvores mortas de *Pinus elliotii* var. *elliotii*, em plantio com infestação natural de armilariose, segundo os tratamentos com formaldeído e *Trichoderma viride*. Santa Maria do Oeste, 2003-2008

Ao final dos 49 meses de acompanhamento (janeiro/2008), a mortalidade de plantas foi de 12,3% no tratamento testemunha, 11,7% no tratamento com formaldeído e antagonista e 11,3% quando aplicou-se somente o antagonista (Figura 2). Apenas, o tratamento com formaldeído apresentou um número de árvores mortas de *P. elliotii* var. *elliotii* menor (5,7%). Segundo Chang et al. (1983), o uso de formaldeído em doses sub-letais para o controle de fungos em pomares de maçã e pera na China, estimulou a população de *Trichoderma* do solo, permitindo o controle de *Armillaria*.

Os resultados obtidos com o isolado *T. viride* T-15 parecem não estimular o uso de antagonistas no controle da armilariose em pinus. Em ensaio de campo com macieiras, Raziq (1998) citado por Raziq (2000) não encontrou diferenças significativas entre o tratamento com *Trichoderma* e a testemunha constituída do substrato esterilizado que foi utilizado para produzir o inóculo do antagonista. Contudo, o primeiro autor verificou que nos tratamentos com *Trichoderma*, a superfície infectada das raízes das macieiras foi menor que a superfície das raízes da testemunha.

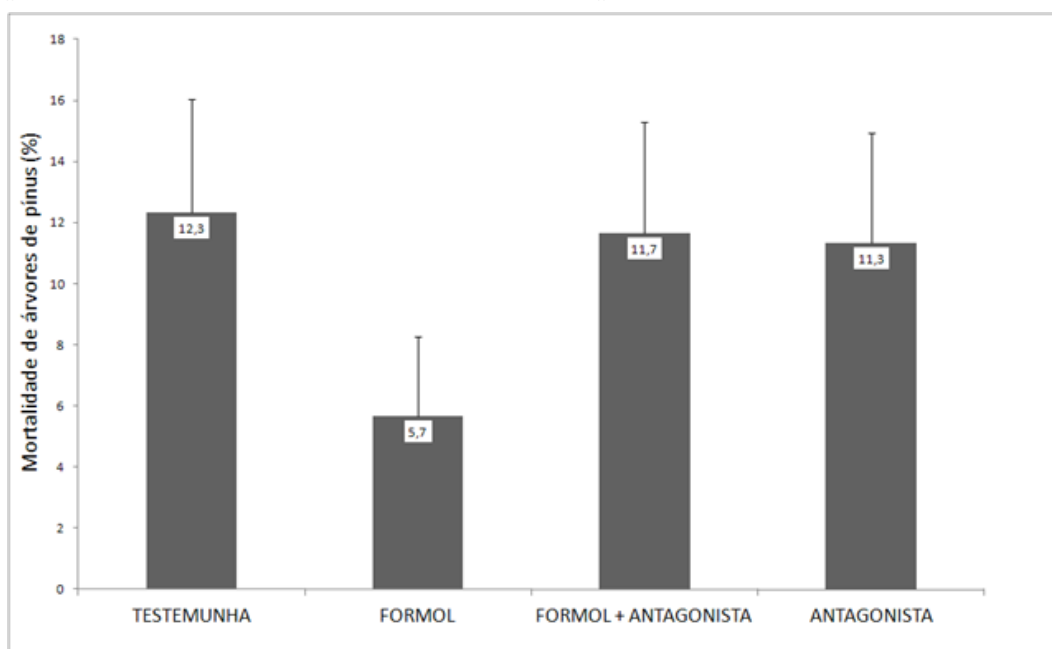


Figura 2. Mortalidade de árvores de *Pinus elliotii* var. *elliotii* em um plantio com quatro anos de idade, naturalmente infestado com *Armillaria* sp., após 49 meses dos tratamentos com *Trichoderma viride* e formaldeído. Santa Maria do Oeste, 2003-2008

A menor incidência da armilariose no tratamento com apenas formaldeído pode ter eliminado parte do inóculo presente no solo, resultando em menor quantidade de árvores mortas. Ressalte-se, porém, que os tratamentos foram aplicados em uma área naturalmente infestada e que a parcela pode ter sido montada em uma parte com menor potencial de inóculo em relação aos outros tratamentos, implicando em menor quantidade da doença, ao longo do tempo.

A ausência de controle da armilariose nos tratamentos com *T. viride* pode ser explicada pela aplicação do antagonista em dose única no ensaio (novembro/2003). De acordo com Papavizas (1982), a população do fungo *Trichoderma* tende a diminuir no solo com o passar do tempo, e o controle biológico vai perdendo o seu efeito. Ensaio de controle biológico de *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. com *Trichoderma atroviride* P. Karst. SC1 em

vinhedos demonstraram alta concentração de unidades formadoras de colônias (UFC) na superfície de solos até 18 meses da aplicação do antagonista (LONGA et al. 2009). Após um ano, Longa et al. (2009) também verificaram que a quantidade de UFC de *T. atroviride* em solos tratados com esse antagonista foi similar às quantidades de UFCs de espécies nativas de *Trichoderma*. Deste modo, fica implícita a necessidade de várias aplicações em áreas infestadas com *Armillaria*, a exemplo do que é feito com os fungicidas, para uma haja eficiência do controle da armilarirose, conforme comentado por Raziq (2000).

A época do ano pode influenciar o uso de antagonistas no controle de *Armillaria*, pois condições ecológicas adequadas ao antagonista são imprescindíveis para o estabelecimento de um programa eficaz de controle biológico (LONGA et al., 2009). A aplicação de *Trichoderma* deve ser feita em períodos do ano de temperatura mais elevada, próximas da temperatura ótima de crescimento do antagonista (MUNNECKE et al., 1981). No presente estudo, o isolado de *T. viride* T-15 apresenta crescimento ótimo a 25 °C ou mais (FERREIRA et al., 2005), próxima às encontradas na superfície de solos no período de verão, garantindo o seu estabelecimento e sobrevivência.

Referências

BRUHN, J. N.; MIHAIL, J. D.; MEYER, T. R. Using spatial and temporal patterns of *Armillaria* rot disease to formulate management recommendations for Ontario's black spruce (*Picea mariana*) seed orchards. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 26, n. 2, p. 298-305, 1996.

CHANG, L. W.; LIU, Q. F.; CAO, X. W. Experiments on the control of the root rot disease (*Armillaria tabescens*) of fruit trees by using formaldehyde. **Acta Phytopathologica Sinica**, Beijing, v.13, p. 37-43, 1983.

FERREIRA, M. M.; SILVA, F. B.; AUER, C. G. Estudo preliminar sobre as temperaturas de desenvolvimento de *Trichoderma viride*. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 4., 2005, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 1 CD ROM. 1p.

Uma próxima etapa da pesquisa a ser desenvolvida será feita com o uso de produtos biológicos comerciais à base de *Trichoderma*, em aplicações parceladas ao longo do ano juntamente com formaldeído. Com esta estratégia, espera-se que a aplicação parcelada do antagonista possa ser mais eficiente, pela manutenção da população do antagonista em altos níveis no solo.

Conclusão

A aplicação do antagonista *T. viride* T-15 em parcelas infestadas com a armilarirose não controlou da doença. Somente o uso de formaldeído, substância química de efeito fumigante no solo, reduziu a incidência da doença.

Agradecimentos

Os autores agradecem à pesquisadora Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, pela cessão do isolado de *T. viride* e das informações para a elaboração do ensaio, ao pesquisador Edílson Batista de Oliveira da Embrapa Florestas pelo auxílio na análise estatística, à Ibema Cia. Brasileira de Papel S.A. pela área florestal cedida e ao apoio à pesquisa e ao CNPq pelo apoio financeiro (projeto e bolsa de produtividade).

FOX, R.T.V. **Armillaria Root Rot**: biology and control of honey fungus. Andover: Intercept Limited. 2000. 222 p.

GOMES, N. S. B. **Armillarose em *Pinus elliottii*: etiologia, determinação de danos e medidas de controle, nos estados do Paraná e de Santa Catarina**. 2005. 96 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GOMES, N. S. B.; AUER, C. G. Potencial antagonístico de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* sp. in vitro contra *Armillaria* sp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 61-62, 2003.

HAGLE, S. K.; SHAW, C. G. Avoiding and reducing losses from *Armillaria* root disease. In: SHAW, C.G.; KILE, G.A. (Eds.). **Armillaria root disease**. Agriculture Handbook, n. 691. Washington, USA: USDA, Forest Service, p.157-173. 1991. 239p.

IVORY, M. H. **Diseases and disorders of pines in the tropics** - a field and laboratory manual. Oxford: Oxford Forestry Institute, Overseas Research Publication n.31.1987.92 p.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos pinheiros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. Agronômica Ceres, São Paulo, 2005. cap. 56, p.517-522. 663p.

LONGA, C.M. O.; SAVAZZINI, F.; PERTOT, I. Monitoramento de *Trichoderma atroviride* SC1 em um vinhedo no nordeste da Itália: considerações sobre impacto ambiental e controle biológico de *Armillaria mellea*. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2009. Cap. 11. p. 173-186. 341p.

MUNNECKE, D. E.; KOLBEZEN, M. J.; WILBUR, W. D.; OHR, H. D. Interactions involved in controlling *Armillaria mellea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, n. 5, p. 384-389, 1981.

PAPAVIZAS, G. C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and pea and bean rhizospheres. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 1, p.121-125, 1982.

RAZIQ, F. Biological and integrated control of *Armillaria* root rot. In: FOX, R.T.V. (Ed.). **Armillaria Root Rot**: biology and control of honey fungus.: Intercept Limited, Andover, 2000. p.183-201.

SANHUEZA, R. M. V. **Podridão de raízes de macieira**. Embrapa-CNPFT, Pelotas, 16p. 1988. (EMBRAPA-CNPFT. Documentos, 32).

SHAW, C. G. III. Characteristics of *Armillaria mellea* on pine root systems in expanding centers of root rot. **Northwest Science**, Seattle, v. 54, p. 137-145, 1980.

SWIFT, M. J. The ecology of *Armillaria mellea* (Vahl ex Fries) in the indigenous and exotic woodlands of Rhodesia. **Forestry**, Oxford, v. 45, n.1, p. 67-86, 1972.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Possibilidades do controle biológico de *Phytophthora* em macieira. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Embrapa-CNPDA, Jaguariúna, 1991, p. 303-305.