

Controle biológico da podridão radicular em plantas de limão Cravo

Élida Barbosa Corrêa^{1*}, Katia Cristina Kupper² & Antonio de Goes¹

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de 15 isolados de *Trichoderma* no controle da podridão radicular causada por *Phytophthora parasitica* em plantas de limão Cravo. Dentre os isolados de *Trichoderma* testados, 60% inibiram o patógeno em cultivo pareado e produziram enzimas capazes de degradar a celulose presente no meio de cultura. *T. pseudokoningii* ACB-37, *T. virens* ACB-32, *T. aureoviride* ACB-33 e *T. viride* ACB-14 inibiram o patógeno e foram avaliados quanto a capacidade de controlar a doença em casa-de-vegetação. A adição de suspensão (10^6 esporos.⁻¹) dos isolados ACB-37, ACB-32 e ACB-33, separadamente, ao substrato de cultivo das plantas controlou os danos causados pela doença, promovendo o desenvolvimento das plantas. Conclui-se que os isolados de *T. ACB-37*, *ACB-32* e *ACB-33* são promissores agentes de biocontrole da podridão radicular causada por *P. parasitica* em plantas de limão Cravo.

Termos para indexação: *Phytophthora parasitica*, *Citrus limonia*, *Trichoderma*, gomose.

SUMMARY

Biological control of root rot in Rangpur lime plants

The aim of this work was to evaluate the potential of 15 isolates of *Trichoderma* on the control of root rot caused by *Phytophthora parasitica* in Rangpur lime plants. Among the isolates evaluated, 60% inhibited the pathogen in dual culture and produced enzymes capable of degrading cellulose present in the culture medium. *T. pseudokoningii* ACB-37, *T. virens* ACB-32, *T. aureoviride* ACB-33, and *T. viride* ACB-14 inhibited the pathogen and were evaluated for their ability to control the disease under greenhouse conditions. Suspensions (10^6 spores.⁻¹) of the strains ACB-37, ACB-32 and ACB-33, added separately, onto the substrate in the pots controlled the damage caused by the disease and increased plant development. It is concluded that these three isolates of *Trichoderma* are promising biocontrol agents of root rot caused by *P. parasitica* in plants of Rangpur lime.

Index terms: *Phytophthora parasitica*, *Citrus limonia*, *Trichoderma*, gummosis.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP

* Autor para correspondência - e-mail: elidabcorrea@yahoo.com.br

² Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis, SP

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa importante papel na agronegócio, com destaque na citricultura. Constitui-se no maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo, especialmente o estado de São Paulo, cuja produção no ano de 2009 foi 18.542.989 toneladas (Agrianual, 2010). Entretanto, embora pujante, a cultura é afetada por várias doenças. Neste contexto, destaca-se o complexo resultante de infecções causadas por oomycotas, especialmente os do gênero *Phytophthora*. De ocorrência em todas as regiões que cultivam citros, as doenças causadas por *Phytophthora* spp. são comumente manifestadas por meio de lesão no caule e de podridão de raízes e radículas. No Brasil, a principal espécie é *Phytophthora parasitica* Dastur (Feichtenberger et al., 2005).

O controle das doenças causadas por *Phytophthora* spp. deve ser preventivo, utilizando-se mudas sadias e porta-enxertos resistentes ou tolerantes. De forma preventiva ou curativa o controle químico é empregado por meio da utilização de fosfitos e dos fungicidas fosetyl-Al e metalaxyl (Feichtenberger et al., 2005). Entretanto, além dos custos elevados, o uso indiscriminado de fungicidas na agricultura pode causar inúmeros efeitos deletérios ao meio ambiente (Morandi & Bettiol, 2009). Em razão disso, novas alternativas de controle são estudadas, com destaque àquelas que sejam mais compatíveis aos agroecossistemas, poupadora de capital e sobretudo que mantenha solidamente o caráter de sustentabilidade. Neste contexto, o controle biológico, por meio da utilização de microrganismos antagonísticos ao patógeno tem merecido especial atenção, e em várias interações tem-se mostrado eficiente (Kupper et al., 2003; Kupper et al., 2009; Bettiol et al., 2009).

O objetivo do trabalho foi realizar a bioprospecção de isolados de *T. spp.*, provenientes de pomares cítricos do Estado de São Paulo, no controle da podridão de raízes, causada por *P. parasitica*, em condições de casa-de-vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *P. parasitica* (LRS 32/02) utilizado nos experimentos foi fornecido pelo Dr. Eduardo Feichtenberger (Instituto Biológico, Regional de Sorocaba). A obtenção do isolado foi a partir de amostras de viveiro (substrato/raízes), pelo método de

isca, no ano de 2002. A escolha do isolado LRS 32/02 foi realizada após a realização de teste de patogenicidade na FCAV/UNESP, em plântulas de limão Cravo, por meio da inoculação no colo das plantas. Quinze isolados de *T. spp.* (*T. aureoviride* ACB-03, ACB-33, ACB-34, ACB-36 e ACB-39; *T. koningii* ACB-05, ACB-35 e ACB-38; *T. harzianum* ACB-04, ACB-30 e ACB-31; *T. vires* ACB-32; *T. viride* ACB-14; *T. pseudokoningii* ACB-37 e *T. sp.* ACB-40), inicialmente avaliados para o controle da queda-prematura dos frutos cítricos, foram testados como potenciais agentes de biocontrole de *P. parasitica* em condições *in vitro*. Os isolados foram obtidos por Moretto et al. (2001) a partir de solo cultivado com plantas cítricas de diferentes regiões do Estado de São Paulo e identificados morfológicamente no Laboratório de Micologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Para a avaliação da influência de *T. spp.* no crescimento micelial de *P. parasitica* foi realizado o pareamento dos isolados. Discos com 4 mm de diâmetro de colônias de *P. parasitica*, com sete dias de idade, foram colocados em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Quatro dias após, discos de colônias de *T. spp.* foram transferidos para essas placas a 70 mm de distância do disco de *P. parasitica*, sendo as culturas incubadas em estufa para BOD a 30 °C durante seis dias. A avaliação da produção de metabólitos tóxicos produzidos por *T. spp.* foi realizada por meio da adição do meio fermentado pelos antagonistas, que inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno em cultivo pareado (*T. pseudokoningii* ACB-37, *T. vires* ACB-32, *T. koningii* ACB-38 e *T. viride* ACB-14), ao meio de crescimento para *P. parasitica*. Para tanto, seguiu-se metodologia adaptada de Frighetto & Melo (1995). As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 25°C, durante quatro dias. A avaliação da capacidade de *T. spp.* em degradar a celulose presente no meio de cultura foi realizada utilizando-se metodologia descrita por Hendricks et al. (1995); sendo os isolados de *T. spp.* cultivados em meio de cultura específico e acondicionados em estufa para BOD a 25°C, durante cinco dias. Para a melhor visualização do halo de ação da enzima celulase ao redor da colônia, as culturas foram cobertas com solução HCl a 0,5 M por 15 min. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. O estudo foi conduzido em replicatas, sendo

tomado como referência o valor das médias, as quais foram, posteriormente, submetidas a análise de variância e aplicado o teste de médias.

O ensaio de biocontrole da podridão radicular por *T. spp.* foi realizado com os isolados pré-selecionados *in vitro*; sendo esses multiplicados em placas de Petri contendo meio de aveia-ágar por 15 dias em temperatura ambiente. A multiplicação de *P. parasitica* foi realizada em grãos de trigo esterilizados (150 g de grãos de trigo acrescido de 90 mL de água destilada) e acondicionados em sacos de polipropileno de 24 x 35 cm. Após dois dias foram acrescentados no interior dos sacos 65 mL de água destilada, os quais foram novamente submetidos à autoclavagem por mais uma hora a 121 °C. Vinte e três discos de 5 mm de diâmetro obtidos de colônias do fitopatógeno cultivado em meio cenoura-ágar foram adicionados a cada saco. As culturas foram incubadas por quatro semanas, em temperatura ambiente, no escuro, com agitações diárias para homogeneização da colonização dos grãos de trigo pelo fitopatógeno. Plantas de limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) com seis meses de idade, acondicionadas em vasos de 4 L, contendo substrato autoclavado (três partes de solo + uma parte de areia + uma parte de esterco bovino), foram utilizadas no experimento. O tratamento do solo com os isolados de *T. spp.* foi realizado depositando-se 100 mL de uma suspensão contendo 10^6 esporos.⁻¹, 24 h antes da infestação do solo com o fitopatógeno. Para a infestação do solo, 10 g de grãos de trigo colonizados por *P. parasitica* foram adicionados aos vasos contendo as plantas de limão Cravo. Ferimentos foram realizados nas raízes, com o auxílio de um bastão de ferro, para facilitar a penetração do patógeno. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições e sete tratamentos, sendo um tratamento testemunha; outro com o solo infestado com *P. parasitica* e os demais tratamentos correspondendo ao solo tratado separadamente com cada um dos isolados de *T. spp.* mais infestação com o patógeno. As avaliações referentes à altura e à massa seca do sistema aéreo e radicular das plantas foram realizadas 90 dias após a infestação do solo com o fitopatógeno. As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas utilizando-se o programa Estat (UNESP-Jaboticabal/SP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em cultivo pareado, nove dos 15 isolados de *T.* (ACB-34, ACB-04, ACB-39, ACB-35, ACB-14, ACB-33, ACB-37, ACB-32 e ACB-38) inibiram o crescimento micelial de *P. parasitica*, com inibições que variaram de 18,5% a 25,3% (Tabela 1). A redução do crescimento da colônia de *P. parasitica*, na presença de *T. spp.*, pode ser atribuída à liberação de compostos tóxicos e/ou ao esgotamento de nutrientes do meio de cultura (Tabela 1). Os isolados de *T. spp.* ACB 33, ACB 04, ACB 14, ACB 34, ACB 40, ACB 36, ACB 30, ACB 31 e ACB 35 apresentaram atividade celulolítica, não sendo verificada diferença entre eles (Tabela 1). No teste de produção de metabólitos, com exceção do ACB-14, os isolados de *T.* ACB-32, ACB-37 e ACB-38 testados produziram substâncias que inibiram o desenvolvimento micelial de *P. parasitica* em 62%, 49,6% e 16,6%, respectivamente (Tabela 2).

A adição de *T. pseudokoningii* ACB-37 ao substrato das plantas infestadas com o patógeno promoveu o crescimento e o acúmulo de matéria seca do sistema aéreo das plantas de limão Cravo, quando comparado com o tratamento com *P. parasitica* sem o tratamento prévio com o antagonico. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente com relação à altura e à massa seca do sistema aéreo (Tabela 3). A adição de *T. pseudokoningii* ACB-37, *T. virens* ACB-32 e *T. aureoviride* ACB-33 protegeu as plantas de limão Cravo da podridão radicular causada por *P. parasitica*, proporcionando maior acúmulo de massa seca do sistema radicular, sendo esse aumento superior ao tratamento com *P. parasitica*. Os tratamentos com *T. koningii* ACB-38 e *T. viride* ACB-14 não protegeram as plantas da diminuição da massa do sistema radicular causada pela doença (Tabela 3).

Parte dos resultados obtidos *in vivo* pode ser comparada com os dados obtidos por May et al. (2001). Segundo os autores, cinco isolados de *T. spp.* selecionados por meio da técnica de pareamento e de produção de metabólitos, utilizando papel celofane, foram estudados quanto a capacidade de controlar a podridão radicular causada por *P. parasitica* em mudas de limão Cravo acondicionadas em tubetes. A aplicação de *T. spp.*, veiculado ao substrato por meio de farinha de arroz colonizada, protegeu as plantas da podridão radicular causada pelo patógeno, eliminando-o do substrato.

Tabela 1. Diâmetro médio do crescimento micelial e avaliação da atividade celulolítica de isolados de *T. spp.*

Tratamentos	Diâmetro médio do crescimento micelial (cm) ^x	Diâmetro do halo de degradação da celulose (cm) ^y
<i>Phytophthora parasitica</i>	2,37 a	- ^z
<i>T. harzianum</i> ACB-30	2,13 ab	1,48 a
<i>T. sp.</i> ACB-40	2,03 ab	1,49 a
<i>T. koningii</i> ACB-05	2,01 ab	-
<i>T. harzianum</i> ACB-31	1,98 ab	1,41 a
<i>T. aureoviride</i> ACB-36	1,96 ab	1,48 a
<i>T. aureoviride</i> ACB-03	1,96 ab	-
<i>T. aureoviride</i> ACB-34	1,93 b	1,50 a
<i>T. harzianum</i> ACB-04	1,93 b	1,65 a
<i>T. aureoviride</i> ACB-39	1,91 b	-
<i>T. koningii</i> ACB-35	1,85 b	1,35 a
<i>T. viride</i> ACB-14	1,85 b	1,55 a
<i>T. aureoviride</i> ACB-33	1,85 b	1,65 a
<i>T. pseudokoningii</i> ACB-37	1,85 b	-
<i>T. virens</i> ACB-32	1,79 b	-
<i>T. koningii</i> ACB-38	1,77 b	-

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, em análise efetuada com os dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

^x O diâmetro médio do crescimento micelial dos microrganismo foi avaliado após seis dias de incubação.

^y A atividade celulolítica dos isolados foi avaliada após cinco dias de incubação.

^z *Phytophthora parasitica* não foi avaliada no ensaio de atividade celulolítica e os isolados ACB 39, 37, 38, 03, 32 e 05 não apresentaram atividade celulolítica.

Tabela 2. Diâmetro médio do crescimento micelial e porcentagem de inibição de *Phytophthora parasitica* em meio de cultura adicionado de metabólitos de isolados de *T. spp.*

Tratamentos	Diâmetro médio do crescimento micelial (cm)	Inibição de <i>P. parasitica</i> (%)
<i>Phytophthora parasitica</i>	3,97 a	-
<i>T. viride</i> ACB-14	3,83 a	3,5
<i>T. koningii</i> ACB-38	3,31 b	16,6
<i>T. pseudokoningii</i> ACB-37	2,00 c	49,6
<i>T. virens</i> ACB-32	1,50 d	62,0

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

Tabela 3. Altura e massa seca do sistema aéreo e massa seca do sistema radicular de plantas de limão Cravo tratadas com isolados de *T. spp.* 90 dias após a infestação do substrato com *Phytophthora parasitica*.

Tratamentos	Altura (cm)	Massa seca do sistema aéreo (g)	Massa seca do sistema radicular (g)
Testemunha absoluta	6,53 ab	5,21 ab	2,81 a
<i>T. pseudokoningii</i> ACB 37 + <i>P. parasitica</i>	6,90 a	6,36 a	2,71 a
<i>T. virens</i> ACB 32 + <i>P. parasitica</i>	6,83 ab	6,30 ab	2,82 a
<i>T. koningii</i> ACB 38 + <i>P. parasitica</i>	6,40 ab	5,57 ab	2,31 ab
<i>T. aureoviride</i> ACB 33 + <i>P. parasitica</i>	6,31 ab	5,78 ab	2,49 a
<i>T. viride</i> ACB 14 + <i>P. parasitica</i>	6,15 ab	4,29 ab	1,46 c
<i>Phytophthora parasitica</i>	5,93 b	3,72 b	1,57 bc

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

Os resultados *in vitro* mostraram que *T. pseudokoningii* ACB-37 e *T. virens* ACB-32 foram os que mais inibiram o desenvolvimento de *P. parasitica* por meio do cultivo pareado (Tabela 1) e pela produção de metabólitos tóxicos ao patógeno (Tabela 2); demonstrando que, possivelmente, os mecanismos responsáveis pelo controle da doença nas plantas de limão Cravo (Tabela 3) se deu, provavelmente, por competição e antibiose, uma vez que, os mesmos não apresentaram atividade celulolítica (Tabela 1). Com relação a *T. aureoviride* ACB-33, o mesmo inibiu o crescimento micelial de *P. parasitica*, quando em cultivo pareado e, produziu enzimas capazes de degradar a celulose presente no meio de cultura (Tabela 1). Os estudos *in vitro* com ACB-33 indicam a possibilidade de ocorrência dos mecanismos de ação por competição, antibiose e micoparasitismo no biocontrole da doença *in vivo*. A produção de enzimas capazes de degradar a celulose presente no meio de cultura pode ser um dos subprocessos utilizados pelo agente de biocontrole para o micoparasitismo do patógeno, visto que, *P. parasitica* pertence ao Reino Straminipila e ao Filo Oomycota (Dick, 2001), como patógenos do gênero *Pythium*, possuindo a constituição da parede celular de β -(1,3)-(1,6)-D-glucanas e de celulose. A capacidade de produção de enzimas hidrolíticas por *T. spp.* já foi demonstrada por Barbosa et al. (2001), Marco et al. (2003) e Mohamed & Haggag (2006). Na interação entre *T. harzianum* x *Pythium ultimum*, alguns dos eventos propostos por Benhamou & Chet (1997) para a inibição do desenvolvimento do patógeno incluem o reconhecimento e contato entre as hifas dos microrganismos, a produção de β -1,3-glucanases que enfraquecem a parede celular do patógeno e a produção de celulasas que possibilitam a penetração do antagonista.

A aplicação de *T. viride* ACB-14 ou de *T. koningii* ACB-38 no substrato de cultivo de limão Cravo não protegeu as plantas da podridão radicular, apesar dos isolados inibirem o crescimento de *P. parasitica* quando em cultivo pareado (Tabela 1), de produzir metabólitos tóxicos ao patógeno, como pode ser observado para o ACB-38 (Tabela 2) e de produzir enzimas com capacidade para degradar a celulose, no caso do ACB-14 (Tabela 1). Esses resultados demonstram que nem sempre os resultados *in vitro* são correlacionados aos resultados *in vivo*.

Smith et al. (1990) também verificaram que determinados isolados de *T. spp.* e *Gliocladium spp.* pré-selecionados *in vitro* falharam na proteção das plantas contra a podridão causada por *Phytophthora cactorum* em maçã.

Conclui-se que *T. pseudokoningii* ACB-37, *T. virens* ACB-32 e *T. aureoviride* ACB-33 são promissores agentes de controle da podridão radicular causada por *P. parasitica* em plantas de limão Cravo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriannual - Anuário da Agricultura Brasileira (2010). FNP, São Paulo, p.217-289.
- Barbosa MAG, Rehn KG, Menezes M & Mariano RLR (2001) Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. Brazilian Journal of Microbiology 32:98-104.
- Benhamou N & Chet I (1997) Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. Applied and Environmental Microbiology 63(5):2095–2099.
- Bettiol W, Morandi MAB, Pinto ZV, Paula Jr TJ, Correa EB, Moura AB, Lucon CMM, Costa JB & Bezerra JL (2009) Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 17:111-147.
- Dick MW (2001) The Peronosporomycetes. The Mycota VII: Systematics and evolution In: McLaughlin DJ, McLaughlin EG & Lemke PA (Eds.). Berlin, p.39-72.
- Feichtenberger E, Bassanezi RB, Spósito MB & Belasque Jr J (2005) Doenças dos Citros. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamim Filho A & Camargo LEA (Eds). Manual de Fitopatologia. São Paulo, v.2, p. 239-270.
- Frighetto RTS & Melo IS (1995) Produção de antibióticos por microrganismos. In: Melo IS & Sanhueza RMV (Coords). Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.40-46.

Hendricks CW, Doyle JD & Hugley B (1995) A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2016-2019.

Kupper KC, Bellotte JAM & Goes A (2009) Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31(4):1004-1015.

Kupper KC, Gimenes-Fernandes N & Goes A (2003) Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira* 28(3):251-257.

Marco JL, Valadares-Inglis MC & Felix CR (2003) Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:33-38.

May LL, Ghini R & Kimati H (2001) Solarização e *Trichoderma* para controle de *Phytophthora parasitica* em mudas de citros. *Laranja* 22 (2) 395-409.

Mohamed HAA & Haggag WM (2006) Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:181-191.

Morandi MAB & Bettiol WG (2009) Controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol W & Morandi MAB (Eds). *Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas*. Jaguariúna, p.7-14.

Moretto KCK, Gimenes-Fernandes N & Santos JM (2001) Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of 'Tahiti' lime detached flowers. *Summa Phytopathologica* 27(4):357-364.

Smith VL, Wilcox WF & Harman GE (1990) Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80(9):880-885.

Recebido: 25/07/2011 – Aceito: 02/01/2012
(CRT 043-11)