

CONTROLE DE *Colletotrichum truncatum* AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO-FAVA POR *Trichoderma* spp.

José Manoel Ferreira de Lima Cruz; Otília Ricardo de Farias; Mônica Danielly de Mello Oliveira; Rommel dos Santos Siqueira Gomes; Luciana Cordeiro do Nascimento

Universidade Federal da Paraíba, cruz.jmfl@gmail.com, otiliarfarias@gmail.com, monicadmportella@gmail.com, pratacca@gmail.com, luciana.fitopatologia@gmail.com,

Resumo: O feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma das culturas de maior importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil, por ser bem adaptada as condições edafoclimáticas do Semiárido. Apesar disso, essa cultura apresenta baixa produtividade e vários são os fatores que podem estar associados a isso, como a ocorrência de doenças, entre elas a antracnose, causada pelo *Colletotrichum truncatum*. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o controle de *Colletotrichum truncatum in vitro* da cultura do feijão-fava por isolados de *Trichoderma* spp. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia, da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia – Paraíba. Os isolados de *Trichoderma* spp. (LafitT01, LafitT02, LafitT03, LafitT04 e LafitT05) e *Colletotrichum truncatum* utilizados neste trabalho pertencem à Coleção de Microrganismo do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba. Os isolados foram inicialmente confrontados *in vitro* com o patógeno em testes de cultura pareada e antibiose a 25°C, com os resultados do crescimento micelial foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do patógeno e a taxa de crescimento micelial. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 6 repetições. Detectou-se ação antagonista de todos os isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial, porcentagem de inibição e taxa de crescimento micelial de *C. truncatum* no teste de confronto direto e antibiose, quando comparado com a testemunha. Todos os 5 isolados de *Trichoderma* spp. foram agrupados na classe 1, sendo considerados altamente eficiente no controle do patógeno. A produção de metabólitos voláteis é um mecanismo de ação comum a todos esses isolados.

Palavras-Chave: *Phaseolus lunatus*, controle biológico, antagonismo, antracnose.

Introdução

O feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.) é considerada uma das culturas de maior importância econômica e social para a região Nordeste do Brasil (Santos et al., 2008), onde constitui uma importante alternativa de renda para pequenos produtores que praticam a agricultura familiar, bem como fonte alimentar para população devido ser nutricionalmente rica, principalmente em proteínas, o que a faz ser utilizado tanto na dieta humana como animal (Oliveira et al., 2004). Além disso, essa leguminosa também pode ser usada como adubo verde e cobertura solo (Pegado et al., 2007).

Mesmo sendo uma cultura bem adaptada as condições edafoclimáticas da Região Nordeste a mesma apresenta baixa produtividade e vários são os fatores que podem estar associados a isso, como a ocorrência de doenças (Silva et al., 2014). Dentre as doenças que acometem o feijão fava no seu cultivo e que pode estar associados a baixa produtividade, a antracnose, causada pelo *Colletotrichum truncatum* é encontrada com frequência em campos de produção no Estados de

Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí (Carvalho, 2009), havendo a necessidade de adoção de medidas que possam controlar ou minimizar os impactos negativos desse microrganismo nos campos de cultivo.

Apesar da eficiência do tratamento químico no controle de patógenos de plantas, seu uso vem perdendo expressão, devido custo elevado, impactos negativos sobre o ambiente, animais e homem, procura por alimentos sem resíduos de agrotóxicos pelo mercado consumidor e surgimento de patógenos resistentes (Hillen et al., 2012). Com isso, pesquisadores têm buscado por métodos eficientes de manejo de doenças baseados na utilização de controle biológico, a partir do emprego de *Trichoderma* spp. (Carvalho et al., 2011; Lazarotto et al., 2013; Pereira et al., 2014).

O *Trichoderma* spp., compreende fungos de vida livre, que se reproduzem assexuadamente, presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (Machado et al., 2012). Esse microrganismo atua no controle de diversos fitopatógenos por diferentes mecanismos de ação, como antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas que degrada a parede celular, competição por nutrientes e substrato e indutores de resistência (Pereira et al., 2014). Além disso, são caracterizados por serem resistentes a substâncias tóxicas produzidos por outros microrganismos, tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (Daryaei et al., 2016) e não causam doenças em plantas, com isso, os tornam de elevado interesse para uso como agente de controle biológico de fitopatógenos.

Diante disso, este trabalho teve o objetivo de avaliar o controle de *Colletotrichum truncatum* da feijão-fava *in vitro* por isolados de *Trichoderma* spp.

Metodologia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais (DFCA), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II, localizado no município de Areia, Paraíba.

Os isolados de *Trichoderma* spp. (LafitT01, LafitT02, LafitT03, LafitT04 e LafitT05) e *Colletotrichum truncatum* utilizados neste trabalho pertencem à Coleção de Microrganismo do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba. A seleção dos cinco isolados do antagonista e do patógeno para este estudo foi baseado em resultados de ensaios anteriores.

Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *C. truncatum* em cultura pareada

O patógeno foi repicado três dias antes do antagonista, opostamente em cada placa Petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas a 25°C, com fotoperíodo de 12h.

Para avaliação da eficiência do antagonista foram realizadas as seguintes avaliações: consistiram nas medições do diâmetro das colônias do patógeno, agrupamento dos isolados em classes, porcentagem da inibição do crescimento micelial do patógeno e taxa de crescimento micelial do patógeno.

Teste do pareamento de culturas foi realizada através da metodologia de cultura pareada (Dennis; Webster, 1971). A classificação do antagonismo foi de acordo com escala descrita por Bell et al. (1982), com observações realizadas aos 10 dias de cultivo pareado, onde a classe 1: *Trichoderma* spp. cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; classe 2: *Trichoderma* spp. cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; classe 3: *Trichoderma* spp. ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; classe 4: *Trichoderma* spp. cresce sobre 1/3 da superfície do meio; classe 5: *Trichoderma* spp. não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

Foram realizadas medições do diâmetro da colônia do patógeno com régua milimetrada, aos 10 dias após incubação, em dois eixos ortogonais, descartando-se o disco repicado da colônia pura, sendo posteriormente calculada a média.

Com os dados de crescimento micelial foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do patógeno e a taxa de crescimento micelial (TX), de acordo com as formulas apresentadas abaixo:

$$PIC = (Dc-Dt)/Dc \times 100$$

Onde: Dc= diâmetro da colônia no tratamento controle;

Dt= diâmetro da colônia em determinada dose.

$$Tx = Df/ND \times 100$$

Onde: Df= diâmetro final da colônia;

ND = números de dias de incubação.

Ação dos metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *C. truncatum*

Após três dias de crescimento de *C. truncatum* em meio BDA a 25°C e fotoperíodo de 12h, bases de outras placas de Petri de tamanho correspondente, contendo o *Trichoderma* spp. foram sobrepostas e vedadas com plástico filme transparente. As placas foram incubadas nas condições mencionadas, de forma que as bases superiores fossem aquelas que continham o patógeno. Após 10 dias, quando a colônia testemunha (base contendo apenas BDA solidificado) encontrava-se totalmente colonizada, mediu-se o diâmetro das colônias de *C. truncatum*.

Com os dados de crescimento micelial foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do patógeno e a taxa de crescimento micelial (TX), de acordo com as formulas já descritas anteriormente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando *software* estatístico Sisvar versão 5.4 (Ferreira, 2010).

Resultados e discussão

Detectou-se ação antagonica dos isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial, porcentagem de inibição e taxa de crescimento micelial de *C. truncatum* no teste de confronto direto, sendo a interação significativa, quando comparada com a testemunha. Todos os 5 isolados de *Trichoderma* spp. foram agrupados na classe 1, ou seja, os mesmo cresceram sobre o patógeno e ocuparam toda a superfície do meio (Tabela 1). Além de colonizar eficientemente o meio, constatou-se que os mesmos produziram esporos em abundância sobre as colônias de *C. truncatum*. E esse resultado se deve, possivelmente, à competição por espaço e nutrientes presentes no meio de cultura e/ou ao hiperparasitismo.

Tabela 1 - Crescimento de *Colletotrichum truncatum* em cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* spp., classificação dos isolados quanto ao antagonismo, segundo escala de Bell et al. (1982), porcentagem de inibição (PIC) do patógeno e taxa de crescimento micelial (TX).

Tratamento	Crescimento de <i>Colletotrichum truncatum</i> (cm)	Classificação	PI (%)	TX (%)
------------	--	---------------	-----------	-----------

Testemunha	8,00a	-	-	79,7a
LafitT01	3,49b	1	56,2b	34,9b
LafitT02	2,63c	1	67,0a	26,3c
LafitT03	2,53c	1	68,2a	25,3c
LafitT04	2,66c	1	66,6a	26,6c
LafitT05	2,44c	1	69,3a	24,4c
CV (%)	3,8	-	2,7	3,8

Gava; Menezes (2012) também constataram potencial antagonico de *T. koningii* e *T. polysporum* no controle de patógenos de solo na cultura do meloeiro, onde verificaram maior número de plantas e, conseqüentemente, uma maior produtividade de frutos. Esses mesmos autores observaram que esses isolados colonizaram ativamente a rizosfera tornando esse ambiente inóspito para o crescimento de microrganismos patogênicos. O uso de bioformulados à base de *T. harzianum*, foram eficientes na redução da podridão branca, causada por *Sclerotium cepivorum* em alho (*Allium sativum* L.) (Mahdizadehnaraghi et al., 2015). Semelhantemente, Sbravatti Junior et al. (2016) constataram que *Trichoderma atroviride* reduziu a severidade do mofo cinzento (83,5%), causado por *Botrytis cinerea* em mudas de *Eucalyptus benthamii*. De acordo com Vinalle et al. (2008) esses microrganismos promovem a proteção das plantas através da eliminação de propágulos de patógenos por micoparasitismo, produção de metabólitos antibióticos e enzimas líticas ou pela competição por nutrientes e ainda podem atuar como indutores de resistência.

Pelo teste de antibiose foi possível quantificar a produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp., quem não permitiram o crescimento de *C. truncatum* no meio (Tabela 2). Verificou-se diferença significativa dos isolados na redução do crescimento micelial, porcentagem de inibição do patógeno e na taxa de crescimento micelial, quando comparados com a testemunha no teste de metabólitos voláteis, as quais não diferirem entre si.

Tabela 2 - Efeito inibidor de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial, porcentagem de inibição (PIC) e taxa de crescimento micelial (TX) de *Colletotrichum truncatum*.

Tratamento	Crescimento de <i>Colletotrichum truncatum</i> (cm)	PI (%)	TX (%)
Testemunha	8,00a	-	83,5a

LafitT01	1,75b	79,0a	17,5b
LafitT02	1,85b	77,8a	18,5b
LafitT03	2,11b	74,7a	21,1b
LafitT04	1,36b	83,7a	13,6b
LafitT05	1,72b	79,3a	17,2b
CV (%)	16,67	7,79	16,67

A primeira etapa para avaliação da capacidade de biocontrole de *Trichoderma* spp. é a caracterização potencial antagonista desses microrganismos (Mbarga et al., 2012). E esse potencial já foi constatado em inúmeras pesquisas sobre diversos patógenos, em várias culturas. Martini et al. (2014) constataram a produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* spp., usados para inibir o desenvolvimento de *Fusarium* sp. e *Bipolaris oryzae* na cultura do arroz. Carvalho et al., 2014, observaram uma redução significativa da incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pela ação de *T. harzianum*, com colonização da superfície da sementes e hipocótilo pelo antagonista, sendo esta, segundo os autores, a principal característica para seleção de potenciais agentes de biocontrole. Na figura 2A, podemos observar o crescimento de *Trichoderma* spp. sobre a colônia de *C. truncatum* no teste de confronto direto e na figura 2B o efeito inibitório dos metabólitos voláteis produzidos por esses antagonista sobre o crescimento micelial do patógeno.

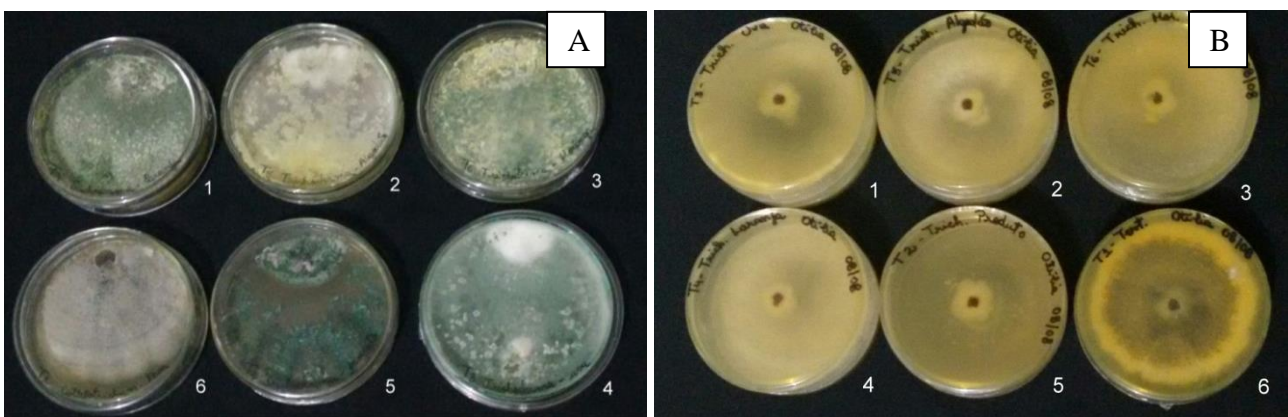


Figura 2. Antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum truncatum*, após o teste de confronto direto (A) e ação dos metabólitos voláteis (B). A1 até A5: Zona de contato de *Colletotrichum truncatum* com UFPB01, UFPB02, UFPB03, UFPB04 e UFPB05, respectivamente no teste de confronto direto. A6: Crescimento micelial rápido e esporulação densa de *Colletotrichum truncatum*. B1 até B5: Crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* sobre ação dos metabólitos voláteis produzidos por UFPB03, UFPB04, UFPB05, UFPB01, UFPB02,

respectivamente. B6: Crescimento micelial rápido e esporulação densa de *Colletotrichum truncatum*.

Embora já se tenha comprovado a eficiência do efeito antagonista de *Trichoderma* spp. para diversos fungos fitopatogênicos, no Brasil, ainda é pouco usado o controle biológico, devido a limitada disponibilidade de produtos comerciais à base desse fungo com registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Apesar dos esforços de pesquisadores, a difusão de conceitos, vantagens e ações dos produtos biológicos ainda é incipiente, o que possibilita a manutenção da hegemonia do uso de produtos químicos (Machado et al., 2012). Além disso, ainda há uma carência de respostas acerca das interações entre antagonistas e o patossistemas da cultura da feva. A realização de testes em laboratório e casa de vegetação e a seleção de novos isolados de *Trichoderma* spp. obtidos na nossa Região, adaptados as condições do Semiárido é imprescindível na busca por novas perspectivas para emprego do controle biológico no manejo de doenças causadas por diversos patógenos em diversas culturas.

Conclusões

Os isolados de *Trichoderma* spp. testados possuem ação antagonista contra *Colletotrichum truncatum*. A produção de metabólitos voláteis é um mecanismo de ação comum a todos esses isolados.

Evidencia-se a necessidade de testar esses isolados de *Trichoderma* spp. em condições de casa de vegetação e de campo, para comprovar seu potencial como agentes de biocontrole da antracnose em feijão-fava, causada por *C. truncatum*.

Referências

- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHABELL, D.K.; WELLS, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, v.72, p.379-382, 1982.
- CARMO, M.D.S.; CARVALHO, E.M.S.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A.; CAVALCANTE, G.R.S. Avaliação de acessos de feijão-fava, para resistência a *Colletotrichum truncatum*, em condições de folhas destacadas e campo. *Summa Phytopathologica*, v. 41, n. 4, p. 292-297, 2015.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, n. 1, p. 028-034, 2011.

CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, v. 39, n. 5, p.384-391, 2014.

DARYAEI, A.; JONES, E.E.; GHAZALIBIGLAR, H.; GLARE, T.R.; FALLOON, R.E. Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. *Journal of applied microbiology*, v.120, n.4, p.999-1009, 2016.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, v.57, p.368-369,1971.

FERREIRA, D. F. *Programa computacional Sisvar* – UFLA, versão 5.4, 2010.

GAVA, C.A.T.; MENEZES, M.E.L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 4, p. 633-640, 2012

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

MAHDIZADEHNARAGHI, R.; HEYDARI, A.; ZAMANIZADEH, H. R.; REZAEI, S.; NIKAN, J. Biological control of garlic (*Allium*) white rot disease using antagonistic fungi-based bioformulations. *Journal Of Plant Protection Research*, v. 55, n. 2, p.136-141, 1 2015.

MBARGA, J.B.; TEN HOOPEN, G.M.; KUATÉ, J.; ADIOBO, A.; NGONKEU, M.E.L.; AMBANG, Z.; AKOA, A.; TONDJE, P.R. BEGOUDE, B.A.D. *Trichoderma asperellum*: A

potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*, vol.36, p. 18-22, 2012.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. e ANTONIOLLI, Z. I. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, v.35, n.1, p. 274-288, 2012.

MARTINI, L. B.; ETHUR, L. Z.; DORNELES, K. R. Influência de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de arroz. *Ciência e Natura*, Santa Maria, v. 36 n. 2 p. 86–91, 2014.

PEREIRA, J. L.; QUEIROZ, R. M. L.; CHARNEAU, S. O.; FELIX, C. R.; RICART, C. A. O.; SILVA, F. L.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J.; NORONHA, E. F. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *Plos one*, v. 9, n. 5, 2014.

SBRAVATTI JUNIOR, J. A.; POITEVIN, C. G.; ROBL, D.; SANTOS, Á. F. D.; PIMENTEL, I. C.; DALZOTO, P. D. R.; AUER, C. G. Reduction in gray mold severity in *Eucalyptus benthamii* seedlings treated with *Trichoderma atroviride*. *Summa Phytopathologica*, v. 42, n. 4, p.363-365, 2016.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L. E LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, v.40, n.1, p. 1-10, 2008.