



Antagonismo *in vitro* de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. frente ao agente causador da gomose dos citros *Phytophthora nicotianae*

In vitro antagonism of different isolates of *Trichoderma* spp. against the causative agent of citrus gummosis *Phytophthora nicotianae*

RESUMO

A citricultura no Brasil é afetada por várias doenças, como a gomose, causada por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (synonymous whit *P. parasitica* Dast.), cujo controle é comumente realizado com aplicações de fungicidas e medidas de exclusão. Porém, devido aos custos financeiros e problemas ambientais ocasionados pelo uso intenso destas aplicações, faz-se necessário à busca por métodos alternativos de controle. Dentre os agentes de controle biológico, espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* têm sido amplamente estudadas, como antagonistas de vários patógenos de solo, como é o caso de *Phytophthora* spp. Tais microrganismos, além de biocontroladores, são, também, agentes promotores de crescimento de plantas e, podem agir como indutores de resistência de plantas a patógenos. Este trabalho teve como objetivo avaliar cinco isolados de *Trichoderma* spp. através do crescimento micelial *in vitro* frente ao isolado de *P. nicotianae*. E posteriormente verificar a atividade dos compostos voláteis e compostos antimicrobianos liberados em meio de cultura pelo *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento e crescimento micelial de *P. nicotianae*. Este trabalho visou à bioprospecção de agentes biológicos para o controle do patógeno de citros *P. nicotianae*.

Palavras-chave: Controle biológico; Compostos voláteis; Citricultura, fitopatógeno.

ABSTRACT

Citrus farming in Brazil is affected by several diseases, such as gummosis, caused by *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (synonymous whit *P. parasitica* Dast.), whose control is commonly carried out with fungicides applications and exclusion measures. However, due to the financial costs and environmental problems caused by the intense use of these applications, it is necessary to search for alternative control methods. Among biological control agents, species of fungi belonging to the genus *Trichoderma* have been widely studied as antagonists of several soil pathogens, such as *Phytophthora* spp. Such microorganisms, in addition to being biocontrollers, are also plant growth promoting agents and can act as inducers of plant resistance to pathogens. This work aimed to evaluate five isolates of *Trichoderma* spp. through *in vitro* mycelial growth against the *P. nicotianae* isolate. And subsequently verify the activity of volatile compounds and antimicrobial compounds released in the culture medium by *Trichoderma* spp. on the development and mycelial growth of *P. nicotianae*. This work aimed to bioprospect biological agents to control the citrus pathogen *P. nicotianae*.

Keywords: Biological control; Volatile compounds; Citrus pharming, phytopathogen.

E. B. Pagin

<https://orcid.org/0009-0003-0653-9314>

Universidade Brasil, Descalvado, São Paulo, Brasil

L. Toffano *

<https://orcid.org/0000-0002-7591-0530>

Universidade Brasil, Descalvado, São Paulo, Brasil

F. Mazzoneto

<https://orcid.org/0000-0002-5375-723X>

Universidade Brasil, Descalvado, São Paulo, Brasil

V. P. Melo

<https://orcid.org/0000-0002-5375-723X>

Evolution Soluções Agrobiológicas Laboratório LTDA | Cebio Centro de Especialidades Biológicas, Sorriso, Mato Grosso, Brasil

*Autor correspondente



1 Introdução

Um dos produtos de exportação de destaque no Brasil é a laranja. No Estado de São Paulo, na safra 2021/2022, a área ocupada com pomares de citros foi estimada em 501,8 mil hectares, sendo a área em produção de 464,4 mil hectares. Na respectiva safra, esse estado produziu aproximadamente 270 milhões de caixas de 40,8 quilos de laranja (CONAB, 2023). Além disso, o Brasil é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja, cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados, tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais (FAO, 2023).

Dentre os vários problemas fitossanitários que ocorrem na cultura dos citros, a gomose de *Phytophthora* acarreta redução na produtividade e, conseqüentemente, diminuição no rendimento econômico da cultura. Essa doença surge em todas as regiões produtoras de citros do mundo e é causada por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (synonymous with *P. parasitica* Dast.) (GRAHAM; FEICHTENBERGER, 2015).

No Brasil, *P. nicotianae* é responsável pelos maiores danos em viveiros, apesar da *P. citrophthora* (Sm & Sm,) e outras espécies de *Phytophthora* já terem sido descritas como causadoras da doença. O principal dano causado é a podridão da raiz e do caule, podendo comprometer o bom desenvolvimento das mudas cítricas no campo ou, até mesmo, levá-las à morte, quando a lesão atinge toda a circunferência do tronco (FEICHTENBERGER, 2001).

Phytophthora nicotianae é um oomiceto que produz hifas hialinas, não septadas e esporângios hialinos, se reproduzem tanto na forma sexuada como assexuada; produz estruturas de resistência como oósporos, zoósporos e clamidósporos. A germinação dos esporângios pode ocorrer diretamente pela formação de tubos germinativos, em condições de umidade ou, indiretamente via zoósporos, em condições de água livre ou, estimulada por queda na temperatura (GRAHAM; MENGE, 1999). Em geral, o controle da doença é de forma preventiva por meio do uso de mudas ou porta-enxertos sadios, ou pela utilização de fungicidas como fosetylAl e metalaxil (MATHERON; PORCHAS, 2000). Sendo que o fungicida metalaxil não se encontra no mercado brasileiro, dificultando assim a prevenção de doenças fúngicas em citros.

Entretanto, os custos financeiros e problemas ambientais com aplicações destes produtos têm levado à busca por métodos alternativos de controle e, dentre esses, o controle biológico tem sido estudado, por ser compatível aos agroecossistemas, muitas vezes poupador de capital e, sobretudo, mantém solidamente o caráter de sustentabilidade (CORRÊA et al., 2011).



Dentre os agentes de controle biológico, espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* têm sido amplamente estudadas, como antagonistas de vários patógenos de solo, como é o caso de *Phytophthora* spp. Tais microrganismos, além de biocontroladores, são, também, agentes promotores de crescimento de plantas e podem agir como indutores de resistência de plantas a patógenos (SABA et al., 2012; SAKSIRIRAT et al., 2009).

A eficiência do controle pelo *Trichoderma* está ligada aos mecanismos utilizados contra outros microrganismos, tendo ação de parasitismo, de antibiose, competição, indução de resistência e pela promoção de crescimento em plantas. Uma das características importantes é que o fungo *Trichoderma* se desenvolve em meio de cultura rapidamente, podendo assim atuar de forma antagônica contra outros fungos no meio, uma vez que, as duas espécies em estudo habitam o solo. (LOUZADA et al., 2009).

2 Materiais e Métodos

A) Obtenção e cultivo dos isolados de *Trichoderma* spp.

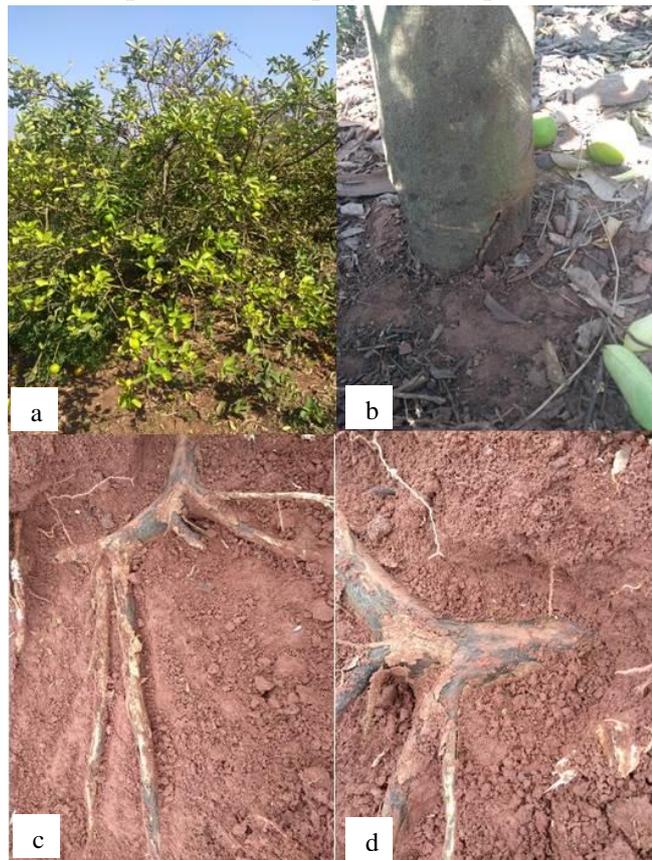
Foram avaliados cinco isolados de *Trichoderma* spp., sendo três isolados provenientes da área experimental do campus de Descalvado da Universidade Brasil, Descalvado - SP, os quais se encontram isolados e cultivados em meio Batata Dextrose Agar (BDA), em BOD à temperatura de 27° C sob fotoperíodo de 12 h., no laboratório de Fitotecnia do campus de Descalvado – SP. São os isolados UBD 18/01; UBD 18/02; UBD 18/03. Os outros dois isolados foram obtidos de instituições externas. Um isolado foi obtido junto ao Departamento de Fitopatologia da Esalq-USP, e o outro isolado, junto ao Departamento de Química do Laboratório de Produtos Naturais da UfSCar, isolados 56/09 e 27/17, respectivamente.

B) Isolamento, cultivo e identificação do isolado *Phytophthora nicotianae*

A coleta de material vegetal doente foi feita na propriedade agrícola Sítio Primavera, situada no município de Porto Ferreira, Estado de São Paulo. Plantas de laranjeira (*Citrus sinensis*) var. Pera, apresentando sintomas de gomose na parte aérea, apresentando amarelecimento nas folhas e rachaduras no tronco próximo ao solo (colo da árvore), foram amostradas (figuras 1a-b). No solo, sob a projeção da parte da copa da planta que apresentavam os sintomas de raízes necrosadas, característica da doença, abriu-se uma trincheira (Figuras 1c-d), retirando cuidadosamente o solo e descobrindo as raízes, sem as decepar. Foram coletadas amostras de solo (cerca de 500 g) em contato e adjacente às raízes que apresentavam necrose recente, sem a presença

de tecido em estado avançado de decomposição. Posteriormente, fragmentos de raízes necrosadas, misturados com o solo amostrado. Todo esse material foi acondicionado em saco plástico e transportado para o Laboratório de Fitotecnia da Universidade Brasil, campus Descalvado.

Figura 1. Planta de laranjeira (*C. sinensis* var. Pera) apresentado amarelecimento e desfolha na parte aérea (a); rachadura no tronco no colo da planta (b); necrose nas raízes presentes sob a projeção da copa (c-d).



Para isolamento, empregou-se a metodologia proposta por Matherom e Matejka (1991), com algumas modificações. Dentro de 48 horas após a amostragem, 50 g de cada amostra de solo+raízes foram colocados em copo de vidro tipo béquer de 1000 mL de volume (Figura 2a). Acrescentaram-se 300 mL de água destilada e esterilizada, seguido de suave homogeneização (Figura 2b). Em seguida, um fruto maduro de pera cv D'anjou foi usado como isca. O fruto foi lavado em água corrente de torneira, seguido da desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 1,0 % durante 1 min., com posterior enxugamento, usando papel absorvente. O fruto foi então mergulhado na suspensão de solo mais raízes no copo, de modo que cerca de 2/3 ficassem imersos (Figura 2c). O copo foi coberto com tela de “nylon” de malha fina para permitir aeração e evitar a

invasão de agentes externos (Figura 2d). Este material foi mantido no laboratório em uma câmara do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) sob temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 h de luz fluorescente.

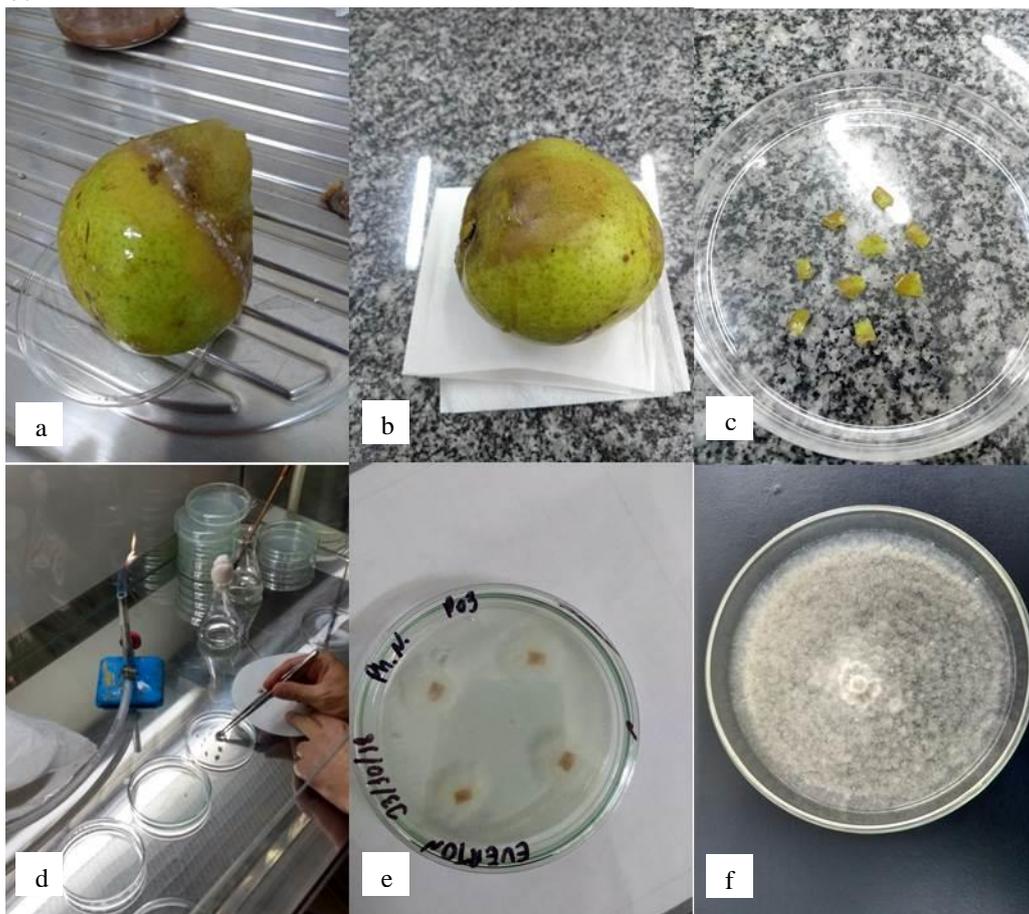
Figura 2. Solo e raízes infectados (a); homogeneização do solo e raízes em H₂O (b); pera cv Danjou imersa em suspensão de solo e raízes (c); material mantido em BOD (d).



Após 6 dias, com o aparecimento de manchas necróticas no fruto, com 3,0 a 5,0 cm de diâmetro, coloração marrom escuro e consistência dura, geralmente ao nível da água (Figuras 3a-b), o fruto foi retirado, lavado em água corrente de torneira e levado para o isolamento. Com o BDA ainda fundente, aproximadamente 50 °C, foi adicionado tetraciclina, 100 µg mL e posteriormente vertido em placas de Petri. Fragmentos de tecido do fruto da região de interseção entre tecido sadio e necrótico foram retirados (Figura 3c) e transferidos diretamente para placa de Petri contendo 15 mL de meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar) (Figura 3d). Em cada placa

de Petri foram colocados quatro fragmentos equidistantes. As placas de Petri foram mantidas em BOD sob luz fluorescente contínua à temperatura de 25 °C. Passados três a cinco dias, quando se observou o desenvolvimento de colônias de *Phytophthora* (hifas com aspecto cotonoso de coloração branca e asseptadas) (Figura 3e), fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo CA (cenoura-ágar: 200 g de cenoura, 18 g ágar, 1000 mL H₂O) (Figura 3f). Após a formação de colônias nesse meio, fragmentos de micélio foram transferidos para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultivo, mantidos em câmara tipo BOD sob escuro contínuo a 25 °C, a fim de se obter crescimento vigoroso do micélio para posterior caracterização e identificação em nível de espécie.

Figura 3. Manchas necróticas em fruto de pera de coloração marrom escuro (a-b); fragmentos de tecido do fruto da região de interseção entre tecido sadio e necrótico (c); fragmentos transferidos para placa de Petri contendo meio BDA (d); fragmentos apresentando colônias de *Phytophthora* (e); colônia isolada de *P. nicotianae* em meio CA (f).





A identificação do oomiceto *Phytophthora nicotianae* foi feita com base na morfologia descrita por Santos et al. (2013), observando-se crescimento micelial cotonoso e de coloração esbranquiçada, o que contribuiu para sua identificação primária.

Para a confirmação da identificação, foram confeccionadas lâminas de microscopia retirando-se parte de estruturas miceliais da colônia instalada em placas de Petri, adicionando-se cerca de 15 mL de água estéril a cada placa, sendo feito a raspagem superficial da placa com uma alça de Drigalski. Em seguida, a solução foi filtrada em gaze estéril e então depositada uma pequena porção sobre uma lâmina de microscopia com auxílio de um pipetador.

C) *Influência dos isolados de Trichoderma spp. no crescimento micelial de Phytophthora nicotianae*

O efeito antagônico dos isolados de *Trichoderma spp.* no crescimento micelial do fitopatógeno foi determinado pela técnica de cultivo pareado em placa de Petri, contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (DENNIS; WEBSTER, 1971). Discos de micélio com 05 mm de diâmetro, retirados de colônias ativas de *P. nicotianae* (7 dias de idade) cultivadas em meio Cenoura-Ágar (CA) foram transferidos para placas de Petri contendo BDA, colocados a 0,5 cm de distância da borda da mesma. Após 3 dias transferidos discos de mesmo tamanho de cada isolado de *Trichoderma spp.* (7 dias de idade) e colocados a 0,5 cm da borda oposta. Foi estipulado essa diferença de tempo entre as transferências dos discos contendo os referidos fungos devido ao crescimento mais vigoroso do *Trichoderma spp.* em relação à *P. nicotianae*. As testemunhas foram representadas pelo patógeno sem a presença dos possíveis antagonistas. A incubação das culturas se deu em estufa B.O.D a 27 °C, sob fotoperíodo de 12 h. A avaliação foi realizada ao longo de 4 dias de incubação, por meio do acompanhamento do crescimento micelial das colônias de *P. nicotianae* e *Trichoderma spp.*

3 Resultados e Discussão

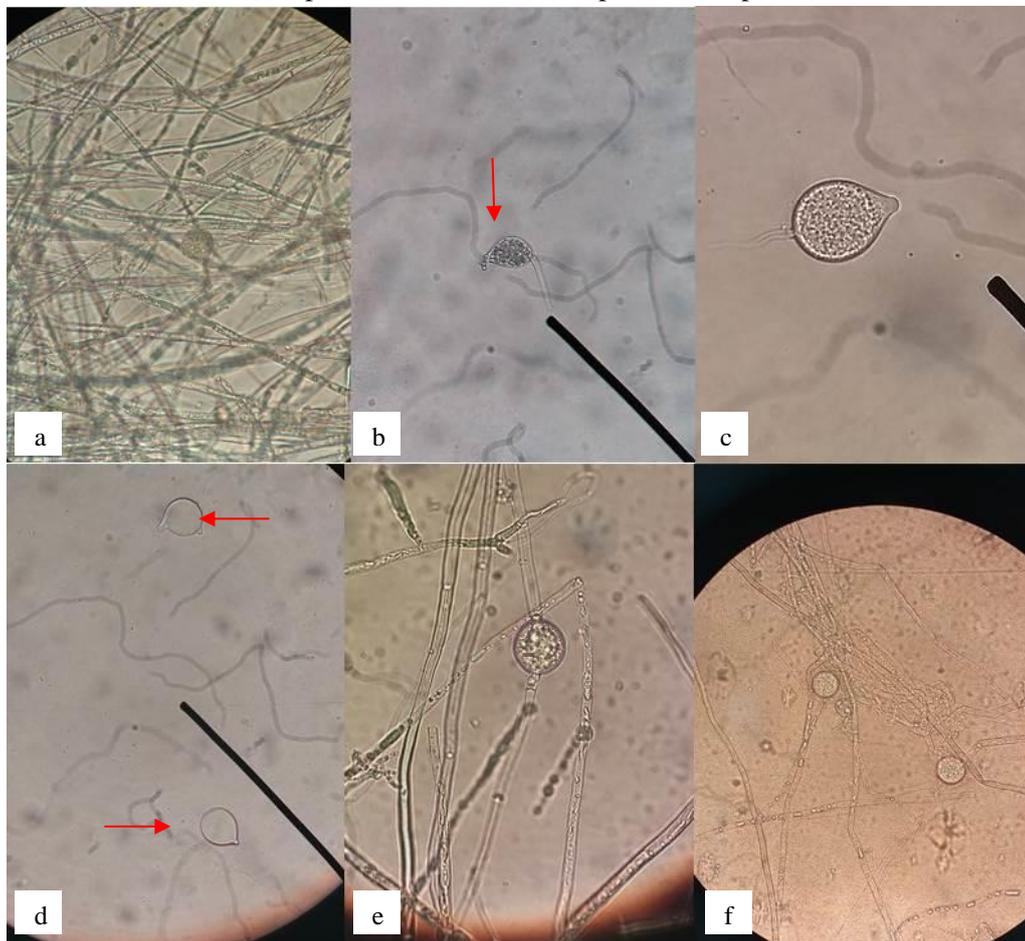
A) *Identificação do isolado de P. nicotianae*

Ao se observar em microscopia com aumento de 40x, 100x e 400x, foram identificadas estruturas características do oomiceto *Phytophthora nicotianae*, segundo literatura utilizada como base para o estudo. Observou-se formação de hifas asseptadas (Figura 4a), com estruturas de reprodução do tipo esporângio (Figuras 4b-d) e pelos esporos de resistência, produzidos por

oomicetos desta espécie, denominados clamidósporos (Figuras 4e-f). Estas observações estão de acordo com as descritas por Graham e Feitchtenberger (2015). Na Figura (4e), além do clamidósporo, como já foi descrito, também é possível observar a presença de hifas cenocíticas (asseptadas).

Após a identificação do oomiceto *P. nicotianae*, foi realizada preservação do isolado através de método de Castellani (em tubos lacrados contendo H₂O destilada esterilizada, foram colocados discos de meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro do fungo), sendo obtidos 6 isolados diferentes, devidamente identificados.

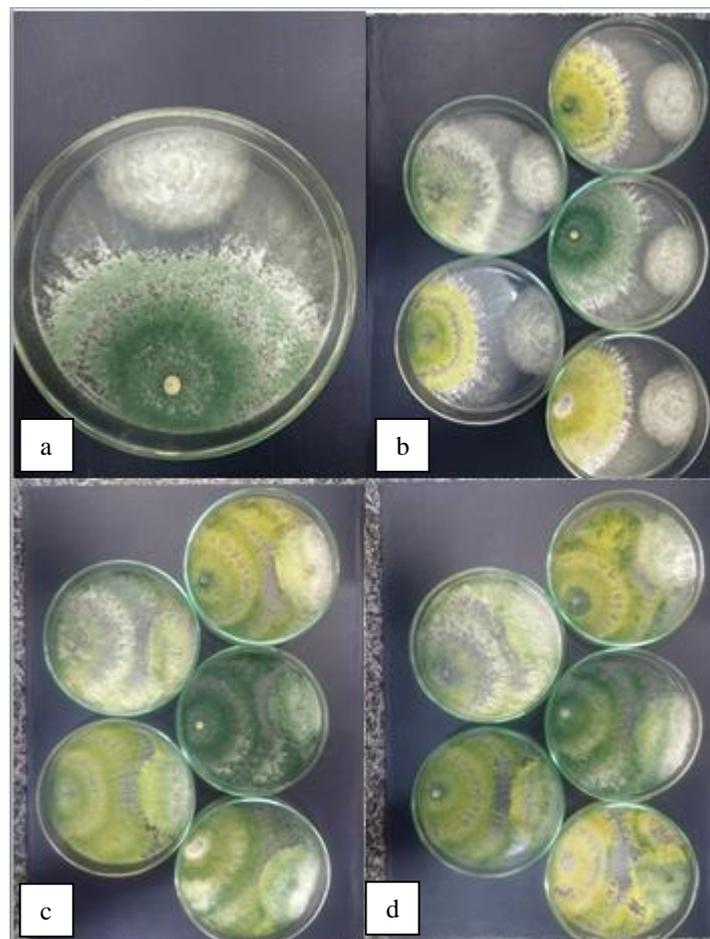
Figura 4. Presença de hifas cenocíticas (a); estruturas reprodutivas do tipo esporângio de *P. nicotianae* (b-d); esporos de resistência do tipo clamidósporo (e-f)



B) Influência dos isolados de Trichoderma spp. no crescimento micelial de Phytophthora nicotianae

Foi observado um crescimento vigoroso da colônia de *Trichoderma* spp. (Figuras 5a-c) crescendo sobre a colônia de *P. nicotiana*e (Figuras 5c-d), sendo que o mesmo, no quarto dia após as transferências dos discos, colonizou completamente a placa de Petri. Não se observou interação entre as colônias de *Trichoderma* spp. e *P. nicotiana*e que sugerisse formação e exudação de compostos antimicrobianos por qualquer um dos dois fungos referidos, como por exemplo, halo de inibição entre ambos.

Figura 5. Crescimento de *Trichoderma* spp. frente à *P. nicotiana*e (a-b); *Trichoderma* spp. crescendo sobre *P. nicotiana*e(c-d).



Esse comportamento sugere que o *Trichoderma* spp. causou parasitismo em *P. nicotiana*e, o que pôde ser observado após a confecção de lâminas de microscopia retirando material micelial da área onde de interação entre os dois fungos (Figura 6a) e sua observação ao microscópio com aumentos de 40x, 100x e 400x. E também indica inibição por competição, uma vez que o fungo, tendo um crescimento mais rápido e vigoroso, coloniza o meio em que está, não dando oportunidade de colonização do meio para o patógeno.

Com a observação da lâmina de microscopia pôde-se constatar que havia uma interação de parasitismo do *Trichoderma* spp. sobre a *P. nicotianae* (Figuras 6b-c; Figura 7). Após a observação das lâminas, discos com 5mm de diâmetro foram retirados da área de interação entre os dois fungos e transferidos para placas de Petri contendo BDA, havendo o crescimento apenas de *Trichoderma* spp. (Figuras 6d-f) o que reforçou a constatação de que o fungo *Trichoderma* spp. causou um parasitismo sobre a *P. nicotianae*.

Figura 6. Sobreposição de micélios de *Trichoderma* spp. e *P. nicotianae*(a); Hifa de *Trichoderma* spp. parasitando hifa de *P. nicotianae* (b-c); *Trichoderma* spp. crescendo em meio BDA (d-f).

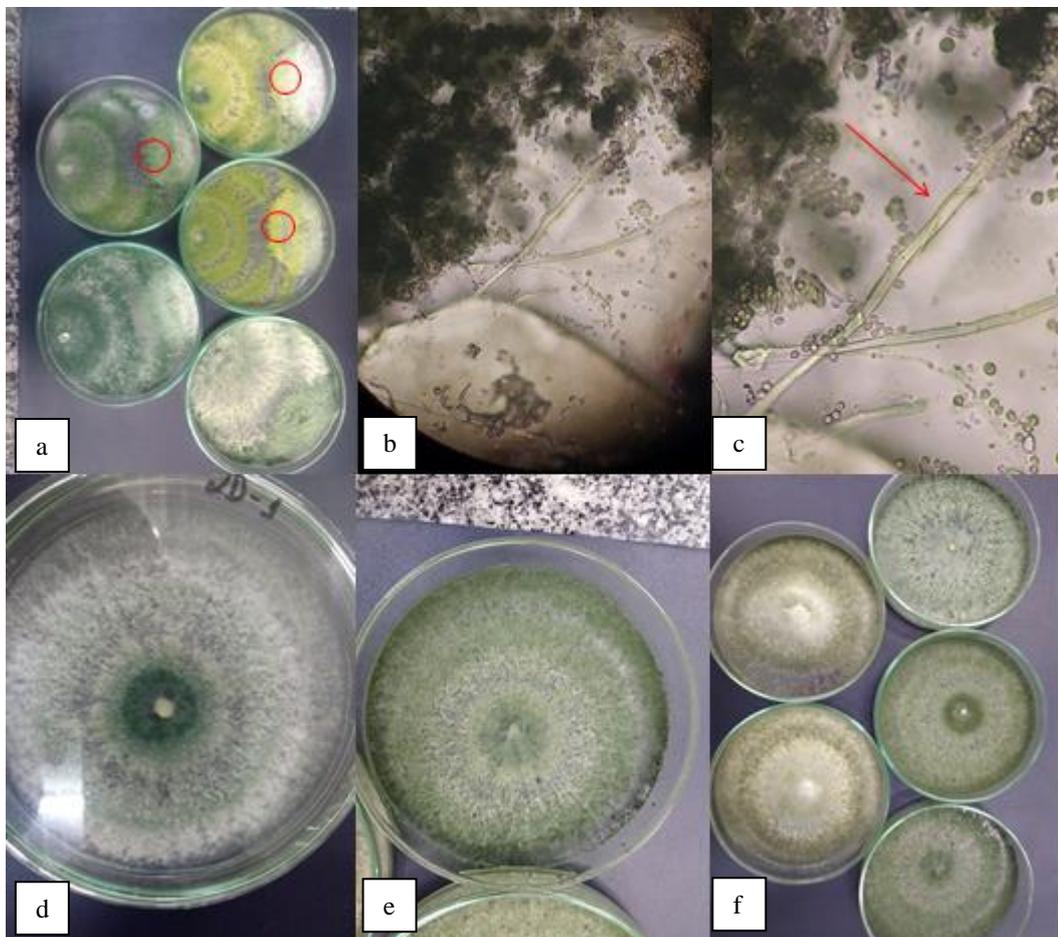


Figura 7. Hifa de *Trichoderma* spp. parasitando hifa de *P. nicotianae*



Em estudos *in vitro*, Bontempo (2016) também demonstrou a ação de isolados de *Trichoderma* spp. com potenciais de controle sobre o fungo *Sclerotium cepivorum*, agente causal da podridão branca da cebola, patógeno que sobrevive no solo e em matéria orgânica.

Gava e Menezes (2012), trabalhando com inoculação de diferentes espécies de *Trichoderma* em sementes de meloeiro amarelo, concluíram que houve colonização efetiva da rizosfera das plantas, com variação entre as espécies estudadas. Apresentaram também controle efetivo de murcha e tombamento nas mudas, sendo que os isolados de *T. koningii* LCB49 e *T. polysporum* LCB50, em comparação com a testemunha, proporcionaram maior estande de plantas e, por consequência, maior produção de frutos em t.ha⁻¹.

Isolados de *Trichoderma* provenientes de diferentes regiões brasileiras apresentaram potencial antagonico contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*, ocorrendo variação no nível de controle, dependendo do isolado e de sua adaptação às condições bióticas e abióticas específicas da região de origem e também apresentando seletividade de acordo com o fitopatógeno a ser controlado. Dos 230 isolados obtidos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, pelo teste de pareamento de culturas, 50 apresentaram efeito inibitório sobre crescimento micelial de *F. solani* e 111 sobre *S. sclerotiorum*. Observou-se, também, que 24 isolados apresentaram antagonismo



sobre os dois fitopatógenos. Cerca de 52% dos isolados não apresentaram efeito inibitório contra *F. solani*, enquanto apenas 14% não apresentaram efeito para *S. sclerotiorum* (LOUZADA et al. 2009)

Isso corrobora o resultado obtido no presente trabalho, demonstrando que o *Trichoderma* spp. é um fungo que atua vigorosamente no controle de fitopatógenos presentes no solo, criando uma oportunidade potencial para testar esses isolados de *Trichoderma* spp. *in vivo*, em plantas de citros com gomose.

4 Conclusão

Com esses resultados obtidos, foi possível a obtenção de um isolado de *P. nicotianae* próprio da Universidade Brasil e no seu estado patogênico, uma vez que foi recém isolado.

Com os resultados obtidos após os ensaios realizados, foi identificado o potencial do *Trichoderma* spp. em realizar controle biológico em *P. nicotianae* através de parasitismo e competição, uma vez que não se observou a formação de halo de inibição entre as duas colônias, sugerindo que não há exsudação de compostos antimicrobianos (antibiose), apenas crescimento micelial do fungo *Trichoderma* spp. sobre a colônia do fungo *P. nicotianae* (parasitismo e competição).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONTEMPO, A. F. **Seleção “in vitro” de isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. em baixa temperatura de crescimento para o controle de *Sclerotium cepivorum*.** 2016. 22 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba, 2016. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7805>. Acesso em: 01 set. 2023.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Laranja, Levantamento.** Brasília, p. 1-11, 2022. Disponível <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 05 maio. 2023.

CORRÊA. E. B.; KUPPER. K. C.; GOES. A. Controle biológico da podridão radicular em plantas de limão cravo. **Citrus Research & Technology**, v. 32, n. 3, p. 127-132, 2011.



DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of Trichoderma production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25-39, 1971.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/home/en>.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K.; SANTOS, A. F.; BEZERRA, J. L. (eds.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria Rural. p. 283 - 342, 2001.

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.

GRAHAM, J. H.; MENGE, J.A. Root diseases. In: TIMMER L. W.; DUNCAN, L. W. Citrus health management. **American Phytopathology Society**, Saint Paul, cap. 12, p. 126 -135, 1999.

GRAHAM, J. H.; FEICHTENBERGER, E. *Citrus phytophthora* diseases: management challenges and successes. **Journal of Citrus Pathology**, p. 1-11, 2015.

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

MATHERON, M.E.; PORCHAS, M. Impacto of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, v. 84, p. 454-458, 2000.

SANTOS, Marcos Vinícius Oliveira dos et al. Novos cultivos agrícolas hospedeiros de *Phytophthora nicotianae*. **Summa phytopathol.** [online], v. 39, n. 2, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/Z6NWjkJN6KtVHcBbY5mQVCp/?lang=pt>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SABA, H.; VIBHASH, D.; MANISHA, M.; PRASHANT, K.S.; FARHAN, H.; TAUSEEF, A. Trichoderma—a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, v. 3, p. 524-531, 2012.



SAKSIRIRAT, W.; CHAREERAK, P.; BUNYATRACHATA, W. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. **Asian Journal of Agricultural and Food Agro-Industry**, p. 99-104, 2009.