

Uso de fungos antagonistas no controlo de doenças de plantas

Francisco Bueno-Pallero¹, Luísa Coelho¹, João Duarte¹, Mário Reis^{1,2}, Carlos Guerrero^{1,2}, Lúcia Dionísio^{1,2}

¹ Universidade do Algarve, FCT, Campus de Gambelas, 8005-114 Faro, Portugal, fbuenopallero@gmail.com

² MeditBio, Centre for Mediterranean Bioresources and Food, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas – Edifício 8, 8005-139 Faro, Portugal.

Resumo

Os microrganismos antagonistas manifestam capacidade supressiva para determinadas doenças das plantas, que pode, em algumas situações, permitir a sua utilização na proteção das plantas contra doenças. Uma das características dos fungos do género *Trichoderma* é a sua capacidade de produzir compostos que inibem o crescimento quer de outros fungos quer de bactérias existentes no solo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antagonista de *Trichoderma gamsii* contra o fungo fitopatogénico *Curvularia* sp. ambos provenientes da coleção de fungos da Universidade do Algarve. Os ensaios foram realizados *in vitro* e *in vivo*. Para o ensaio *in vitro*, recorreu-se ao método de oposição direta. As culturas dos fungos foram obtidas em meio PDA, com incubação a 25°C. Avaliou-se o tipo de interação entre as colónias do fungo antagonista e do fitopatogénico, assim como a percentagem de inibição e a taxa de crescimento de ambos. Os ensaios *in vivo* decorreram em vasos com um volume de 766 cm³, onde se semeou *Agrostis stolonifera* var. *palustris*. O fungo antagonista foi inoculado no início do ensaio e o fitopatogénico sete dias depois. A evolução da mancha foliar causada pelo alastrar da doença nas plantas foi monitorizada diariamente.

Verificou-se que *T. gamsii* apresentou capacidade supressiva contra o fungo fitopatogénico testado, tanto *in vitro* como *in vivo*. Futuramente serão testados outros fungos fitopatogénicos, de forma a promover o controlo biológico das doenças de plantas, reduzindo o recurso aos fitofármacos e contribuindo para a proteção do ambiente e da saúde pública.

Palavras-chave: controlo biológico, fungos fitopatogénicos, *Curvularia*, *Trichoderma gamsii*

Abstract

Use of antagonistic fungi in the control of plant diseases

Antagonistic microorganisms exhibit suppressive capacity for certain plant diseases. Thus, in some situations, they can be used to protect plants against diseases. One of the characteristics of the genus *Trichoderma* is its ability to produce compounds that inhibit the growth of other fungi or bacteria in the soil.

This study aimed to evaluate the antagonistic effect of *Trichoderma gamsii* against the phytopathogenic fungus *Curvularia* sp., both from the fungi collection of the University of Algarve. Assays were performed *in vitro* and *in vivo*. For the *in vitro* assay, the direct opposition method was used. Cultures of the fungi were grown in PDA medium with incubation at 25°C. The type of interaction between the antagonistic and the phytopathogenic fungi, as well as the inhibition percentage and the growth rate of both fungi, were evaluated. *In vitro* testing took place in 766 cm³ pots, where *Agrostis stolonifera* var. *palustris* was sown. The antagonistic fungus was inoculated at the beginning of the assay and the phytopathogenic fungus was inoculated seven days later. The progression of the disease caused by the spread of the pathogenic fungus on plants was monitored daily.

The results suggested that *T. gamsii* had suppressive capability against the phytopathogenic fungus tested, both *in vitro* and *in vivo*. In the future, other phytopathogenic fungi will be tested in order to promote the biological control of plant diseases, reducing the use of pesticides and contributing to the protection of the environment and the public health.

Keywords: biological control, phytopathogenic fungi, *Curvularia*, *Trichoderma gamsii*

Introdução

O crescente conhecimento dos efeitos negativos dos fitofármacos no meio ambiente e na saúde pública exige o desenvolvimento e a implementação de estratégias relacionadas com o controlo biológico das doenças e pragas das plantas. O recurso a compostos ricos em microrganismos

antagonistas, com capacidade de suprimir agentes patogénicos (Barker, 2001; Reis & Coelho, 2011), é uma oportunidade para o desenvolvimento da agricultura biológica (Mehta et al., 2014), sendo ainda necessário aprofundar o conhecimento científico, para que o mercado europeu invista nestes produtos como meio de luta na protecção das culturas (Castaño et al., 2013). Pode-se também recorrer à aplicação dos fungos antagonistas sobre as culturas, empregando produtos comerciais (Chet & Inbar 1994; Infante et al. 2009).

Trichoderma gamsii foi descrito como sendo um fungo antagonista, além de apresentar outras capacidades interessantes no controlo biológico, como o endofitismo e a promoção do crescimento das plantas. Este fungo apresenta uma primeira fase de crescimento com micélio branco, passando mais tarde para uma cor esverdeada, quando começa a produzir esporos; produz um odor característico que ajuda no rápido reconhecimento do género (Rinu et al., 2014). O género *Trichoderma* pertence aos Deuteromicetes e ao grupo de fungos filamentosos (Hyphomycete). Sabe-se que este antagonista apresenta capacidade supressiva para fungos fitopatogénicos, mostrando propriedades adequadas para o controlo biológico (Zhang et al., 2015).

Neste estudo pretendeu-se estudar o efeito de *T. gamsii* no controlo do fungo fitopatogénico *Curvularia* sp. O género *Curvularia* é bem conhecido por apresentar muitas espécies patogénicas para humanos e plantas (Manamgoda et al. 2015). *Curvularia* spp. causa manchas nas folhas e podridão das raízes de leguminosas e gramíneas (Agrios, 1997).

Material e métodos

Ensaio *in vitro*

Com recurso a material esterilizado, retirou-se micélio dos fungos em estudo, com auxílio de um cilindro metálico de 6,5 mm de diâmetro. Os cilindros com o micélio do fungo antagonista e do fitopatogénico foram colocados em meio PDA e à distância de 40 mm entre si, conforme descrito por Fokkema (1973). Cilindros com micélio, quer do fungo antagonista quer do fitopatogénico, foram colocados a crescer individualmente em meio PDA. O ensaio foi realizado em triplicado e a incubação decorreu à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Registaram-se os dados do crescimento radial dos fungos, ao longo de 7 dias, a partir dos quais foram calculadas as taxas médias de crescimento e a percentagem de inibição. A percentagem de inibição foi calculada utilizando o crescimento radial do fungo fitopatogénico *Curvularia* (C) e o crescimento radial do fungo fitopatogénico na presença do antagonista *T. gamsii* (T), através da seguinte equação (Nikolajeva, 2012):

$$\text{Percentagem de inibição} = (C-T)/C \times 100$$

Ensaio *in vivo*

O ensaio decorreu no Horto do *Campus* de Gambelas, da Universidade do Algarve. O Algarve é uma região com clima Mediterrânico, de acordo com a classificação de Köppen (1936), com verões quentes e secos e invernos amenos.

Semeou-se, em vasos com uma superfície de $113,09 \text{ cm}^2$ e uma altura de 6,77 cm (766 cm^3), relva *Agrostis stolonifera* var. *palustris*, com uma densidade de 5 g m^{-2} . Como substrato utilizou-se areia fina, habitualmente utilizada nos campos de golfe. O ensaio decorreu ao ar livre, simulando as condições de cultivo habituais na região. A rega foi efectuada diariamente com solução nutritiva *Peters foliar feed* (Everris, Heerlen, Holanda) a $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Foram incluídos três tratamentos, com inoculação de (1) unicamente o antagonista *T. gamsii*, (2) unicamente o fungo fitopatogénico *Curvularia* sp. (3) e combinação de antagonista e fitopatogénico. Cada tratamento constou de três repetições.

Vinte e um dias após a sementeira, procedeu-se à pulverização de uma suspensão de $1 \times 10^7 \text{ cm}^{-3}$ de esporos do antagonista *T. gamsii*. Passados 7 dias inoculou-se o fungo fitopatogénico sobre o relvado, usando uma suspensão com a mesma concentração que a do antagonista. Após a inoculação do fungo fitopatogénico, procedeu-se à monitorização dos vasos, para registar o aparecimento da doença e o número de manchas, por vaso. Em cada vaso foi determinada a área afetada pela doença, por medição de dois diâmetros perpendiculares em cada mancha.

Os fungos, antagonista e fitopatogénico, usados nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, fazem parte da coleção de fungos da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, cortesia do Laboratório de Microbiologia. Para preparar as suspensões de esporos, tanto do antagonista como do fungo fitopatogénico, estes foram retirados de culturas puras, em meio de cultura PDA, com auxílio de uma zaragatoa estéril. Colocaram-se numa solução de PBS e Tween 20 a 0,05% (Klingen, 2002), sendo a suspensão homogeneizada de seguida para que os esporos ficassem bem desagregados. Para enumeração dos esporos recorreu-se a uma Câmara de Neubauer, de forma a obter uma suspensão com uma concentração de esporos de $1 \times 10^7 \text{ cm}^{-3}$.

Análise estatística

Os resultados relativos ao crescimento radial dos fungos, bem como ao número e área de manchas provocadas pelo desenvolvimento do fungo fitopatogénico nas plantas, foram sujeitos a uma análise da variância e ao teste de separação de médias de Duncan, com programa de estatística SPSS® (versão 22.0, SPSS Inc.). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Ensaio *in vitro*

A taxa média de crescimento do fungo fitopatogénico foi $0,191 \text{ mm h}^{-1}$ e a do fungo antagonista, *T. gamsii*, $0,229 \text{ mm.h}^{-1}$, ambos em cultura pura, enquanto na presença do antagonista, o fungo fitopatogénico apresentou uma taxa de crescimento de $0,076 \text{ mm h}^{-1}$. Os dados obtidos e analisados não diferiram significativamente, de acordo com o teste de separação de médias de Duncan, ao nível de confiança de 95%.

Em placa, o crescimento do fungo patogénico foi inibido até 40% na presença do fungo antagonista. Segundo Wheeler & Hocking (1993), que adaptaram de Magan & Lacey (1984), o tipo de interação entre as duas colónias de fungos classificar-se-ia como uma interação ou inibição de uma das duas espécies em contacto. A espécie inibida (fungo fitopatogénico) continuou a crescer com uma redução muito significativa da sua taxa de crescimento, enquanto a espécie antagonista continuou a crescer a uma taxa ligeiramente reduzida, ou mesmo sem variação no seu desenvolvimento. Este resultado é concordante com o verificado por Coelho et al. (2009), onde *Trichoderma* sp. suprimiu o desenvolvimento de outros fitopatogénicos.

Ensaio *in vivo*

Nos ensaios que decorreram *in vivo*, verificou-se que o antagonista inibiu o crescimento do fungo fitopatogénico até ao dia 17, altura em surgiu a primeira mancha indicadora da doença (fig. 1). Nos vasos onde apenas se inoculou o fungo fitopatogénico, as manchas foliares surgiram ao quinto dia após a inoculação. Estatisticamente, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) até ao dia 26 entre o tratamento onde o fungo fitopatogénico cresceu sozinho e onde se inoculou também o antagonista. No final do ensaio (dias 29 e 31), não se observaram diferenças significativas no número de manchas (fig. 1).

Analisando a área do relvado afectada pelas manchas, verificou-se o efeito supressivo que *T. gamsii* apresentou sobre o fungo fitopatogénico testado. Assim, no tratamento onde se inoculou o antagonista e o fungo fitopatogénico, observou-se que a área afectada pela doença foi inferior à área observada no tratamento onde o antagonista não foi inoculado. O tratamento preventivo da doença com *T. gamsii* também permitiu atrasar o aparecimento das manchas foliares (fig. 2Figura).

De acordo com Kwok et al. (1987), *Trichoderma* spp. é capaz de eliminar fungos patogénicos das plantas, causando-lhe a morte. Pode também atuar por antibiose, produzindo gliotoxina, (Pane & Zaccardelli, 2014) que reduz a taxa de crescimento de fungos fitopatogénicos e evita a sua entrada em plantas saudáveis.

A capacidade supressiva de *Trichoderma* spp. em doenças do solo foi demonstrada por vários autores (Trillas et al. 2006, Coelho et al., 2009, Sant, 2010, Pugliese et al. 2011), sendo a espécie *T. harzianum* a mais estudada. *Trichoderma gamsii* tem sido menos estudada, mas alguns autores descreveram a sua capacidade supressiva em fungos fitopatogénicos como o género *Fusarium* em culturas de trigo (Baroncelli et al, 2016).

Conclusões

Este trabalho permitiu-nos testar o efeito supressivo de *T. gamsii* sobre um fungo fitopatogénico, mostrando resultados positivos no ensaio *in vivo*, com redução do tempo de aparecimento da doença, do número de manchas foliares e da área de relvado afetada pela doença. Uma vez que o fungo antagonista foi inoculado antes do patogénico, conclui-se que *T. gamsii* pode ser um agente de controlo biológico em tratamentos preventivos. Assim, torna-se necessário, em ensaios futuros, testar o seu efeito em tratamentos curativos e com outros fitopatogénicos, contribuindo para que no controlo de doenças das plantas se recorra cada vez mais a meios biológicos e se reduzam os produtos químicos.

Referências

Agrios, G.N. 1997. Plant diseases caused by fungi. In: Plant pathology. (4th edition). Academic Press. San Diego, California, USA.

- Barker, A.V. 2001. Compost utilization in soil production and turf management. In: Stoffella, P.J. & Kahn, B.A. (eds.) Compost utilization in horticultural cropping systems. Lewis Publications. Boca Raton. 201-225.
- Baroncelli, R., Zapparata, A., Piaggieschi, G., Sarrocco, S. & Vannacci, G. 2016. Draft Whole-Genome sequence of *Trichoderma gamsii* T6085, a promising biocontrol agent of *Fusarium* head blight on wheat. Genome announcements 4 (1):e01747-15.
- Castaño, R., Borrero, C., Trillas, M.I. & Avilés, M. 2013. Selection of biological control agents against tomato *Fusarium* wilt and evaluation in greenhouse conditions of two selected agents in three growing media. BioControl 58:105-116.
- Chet, I & Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology 48:1, 37-43.
- Coelho, L., Reis, M. & Dionísio, L. 2009. Capacidade supressiva de *Trichoderma* sp. para doenças do solo. Livro de Resumos do Encontro Anual da Sociedade Portuguesa da Ciência do Solo, Faro, Portugal, 8-10 Julho.
- Fokkema, N.J. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Dreschlera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. Physiological Plant Pathology 3:195-205.
- Infante, D, Martínez, B., González, N. & Reyes, Y. 2009. *Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogen fungi. Revista de Protección Vegetal 24:1.
- Klingen, I., Meadow, R. & Aandal, T. 2002. Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* treated with insect pathogenic hyphomycetous fungi. Journal of Applied Entomology 126 (5):231-237.
- Kwok, O.C.H., Fahy, P.C., Hoitink, H.A.J. & Kuter, G.A. 1987. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. Phytopathology 77:1450-1456.
- Magan, N. & Lacey, J. 1984. The effect of water activity, temperature and substrate on interaction between field and storage fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 92:83-93.
- Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. 2015. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (*Pleosporaceae*): human and plant pathogens. Phytotaxa 212 (3):175-198.
- Mehta, C.M., Uma Palni, Franke-Whittle, I.H. & Sharma, A. K. 2014. Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. Waste Management 34:607-622.
- Nikolajeva, V., Petrina, Z., Vulfa, L., Alksne, L., Eze, D., Grantina, L., Gaitnieks, T. & Lielpetere, A. 2012. Growth and antagonism of *Trichoderma* spp. and conifer pathogen *Heterobasidion annosum* s.l. *in vitro* at different temperatures. Advances in Microbiology 2:295-302.
- Pane, C. & Zaccardelli, M. 2014. Principles of Compost-based Plant Diseases Control and Innovative New Developments. p. 151-171. In: Maheswari, D. (ed). Composting for Sustainable Agriculture. Springer. London.
- Pugliese, M., Liu, B., Gullino, M. L. & Garibaldi, A. 2011. Microbial enrichment of compost with biological control agents to enhance suppressiveness to four soil-borne diseases in greenhouse. Journal of Plant Diseases and Protection, 118 (2):45-50.
- Reis, M. & Coelho, L. 2011. Controlling *Rhizoctonia solani* in cucumber using compost of agro-industrial residues. Acta Horticulturae, 1013:499-505.
- Rinu, K., Sati, P. & Pandey, A. 2014. *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): a newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting and antagonistic fungal strain. Journal of Basic Microbiology 54(5):408-17.
- Sant, D., Casanova, E., Segarra, G., Avilés, M., Reis, M. & Trillas, M.I. 2010. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. Biological Control 53:291-296.
- Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C. & Avilés, M. 2006. Composts from agricultural waste and *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. Biological Control 39:32-38.
- Wheeler, K.A. & Hocking, A.D. 1993. Interactions among xerophilic fungi associated with dried salted fish. J. Appl. Bacteriology 74:164-169.
- Zhang, X., Harvey, P.R., Stummer, B.E., Warren, R.A., Zhang, G., Guo, K., Li, J. & Yang, H. 2015. Antibiosis functions during interactions of *Trichoderma afroharzianum* and *Trichoderma gamsii* with plant pathogenic *Rhizoctonia* and *Pythium*. Functional & Integrative Genomics 15:599-610.

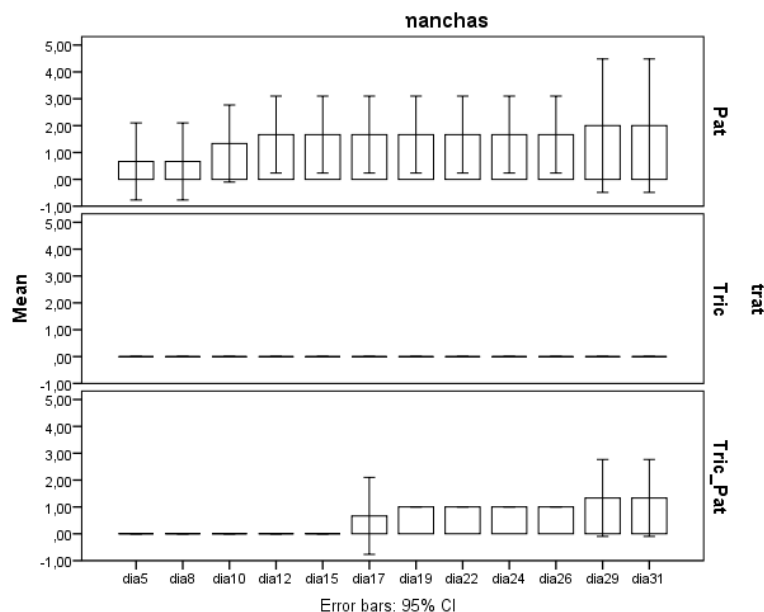


Figura 1 – Número de manchas foliares em *Agrostis stolonifera* var. *palustris* durante o ensaio *in vivo* de interação entre o fungo antagonista *Trichoderma gamsii* e um fungo fitopatogénico nos vários tratamentos. Onde: Pat, aplicação do fungo fitopatogénico; Tric, aplicação de *T. gamsii*; Tric_Pat, aplicação do fungo fitopatogénico e de *T. gamsii*. Os valores apresentados referem-se à média de três repetições. As caixas fechadas indicam o número médio de manchas para cada dia e tratamento. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

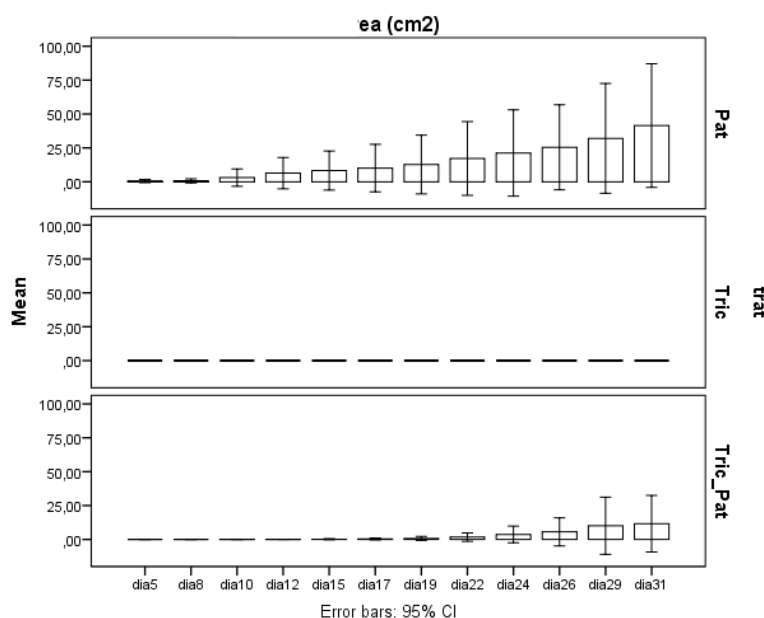


Figura 2 – Área (cm²) das manchas foliares em *Agrostis stolonifera* var. *palustris* durante o ensaio *in vivo* de interação entre o fungo antagonista *Trichoderma gamsii* e um fungo fitopatogénico. Onde: Pat, aplicação do fungo fitopatogénico; Tric, aplicação de *T. gamsii*; Tric_Pat, aplicação do fungo fitopatogénico e de *T. gamsii*. As caixas fechadas indicam a média da área das manchas para cada dia e tratamento. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.