**SELEÇÃO** *in vitro* **DE** *Trichoderma asperellum* **CONTRA** *Thielaviopsis* sp.**CAUSADOR DE RESINOSE EM COQUEIRO**

Aline Figueiredo Cardoso1; Ithalo Paulo dos Santos Silva2; Cássia Cristina Chaves Pinheiro³, Paulo Manoel Pontes Lins4; Gisele Barata da Silva5

1Agrônoma e Doutoranda em Agronomia. Universidade Federal Rural da Amazônia, aline\_f\_cardoso@hotmail.com;

2Acadêmico de Engenharia Ambiental e Energias Renováveis. Universidade Federal Rural da Amazônia. pssilvaithalo@yahoo.com

³Acadêmica de Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, cassiapinheiro002@gmail.com;

4Engº agrônomo e Superintendente Agrícola da Fazenda Reunidas Sococo. paulom@sococo.com.br

5 Drª em Agronomia (Fitopatologia), Universidade Federal Rural da Amazônia.

giselebaratasilva@gmail.com.

**RESUMO**

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta de origem asiática, e o Brasil o quarto maior produtor, com o Pará ocupando a quarta posição em nível nacional. Dentre as principais doenças que podem comprometer seu cultivo podemos destacar a resinose ou Stem bleeding, ocasionada pelo patógeno *Thielaviopsis paradoxa*. Tendo em vista a problemática ambiental em relação a agrotóxicos, o uso de biocontrole de doenças tem se mostrado uma excelente alternativa para a otimização do manejo. Assim a primeira etapa deste trabalho consiste na seleção de *in vitro* de microrganismos antagônicos ao patógeno. O objetivo foi selecionar isolados de *T. asperellum* com ação antagônica sobre *Thielaviopsis* sp., utilizando o método de pareamento direto. Discos de micélio do patógeno *Thielaviopsis* sp.e *T. asperellum* foram semeados equidistantes em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, e mantidas em temperatura (25oC) e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições, utilizando-se quatro isolados de *T. asperellum* (T06,T09, R12 e R52) e tratamento controle (disco somente com meio de cultura). As médias foram comparadas pelo teste de SNK (p-valor≤0.05). Todos os isolados reduziram o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial e o PICR (Potencial de Inibição do Crescimento Radial), do patógeno *Thielaviopsis* sp., Os isolados de *T. asperellum* T09 e T52 destacaram-se com redução superior a 22%. Os estudos de controle biológico da doença devem avançar para a casa de vegetação para avaliar a redução da severidade da resinose.

**Palavras-chave:** Pareamento. Biocontrole. Stem bleeding.

**Área de Interesse do Simpósio**: Agronomia / Microbiologia Ambiental.

**1. INTRODUÇÃO**

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta de origem tropical, com Indonésia, Filipinas e Índia sendo os maiores produtores, enquanto o Brasil é o quarto maior produtor, com produção aproximada de 2,8 milhões de toneladas. O Estado do Pará se destaca com produção de 231.400 mil frutos (MARTINS; JÚNIOR, 2014). A cultura do coqueiro tem grande importância econômica e social, pois além do produto *in natura*, é possível a obtenção de mais de 100 tipos de produtos derivados do coco na indústria de alimentos (MARIANO, 1997).

O cultivo do coqueiro pode ser acometido por diferentes doenças, dentre elas a resinose ou Stem bleeding, que foi descrita pela primeira vez no Estado de Sergipe no ano de 2004, sendo identificado como agente etiológico o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn., que provoca sintomas como a saída de líquido marrom-avermelhado ou cor de ferrugem de rachaduras na planta (WARWICK; PASSOS, 2009).

Tendo em vista a atual problemática ambiental em relação ao uso de agrotóxicos, a utilização de microrganismos no combate de fitopatógenos tem se mostrado uma excelente alternativa para a substituição do mesmo, uma vez que na agricultura são utilizados tanto para produção de crescimento quanto controle biológico de pragas (FORTES *et al*. 2007; FREITAS, 2004). Fungos do gênero *Trichoderma* estão ganhando destaque neste meio, por não serem patogênicos, interagindo com o patógeno de diversas formas antagônicas, como parasitismo, competição, antibiose, e ainda podem auxiliar seu hospedeiro com a produção de compostos que contribuem para que o mesmo adiquira melhorias de defesa e desenvolvimento (PAPAVIZAS, 1985).

Diante do exposto, o objetivo deste experimento foi selecionar isolados de *Trichoderma asperellum* com ação antagônica sobre *Thielaviopsis sp.* provocando resinoseem coqueiros.

**2. MATERIAL E MÉTODOS**

**2.1 Local do experiment**o

O experimento foi realizado no Laboratório de Proteção de Plantas-LPP, localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia- UFRA, campus de Belém, Pará.

**2.2 Obtenção de isolados**

Amostras de estirpe da planta apresentando sintomas de resinose foram coletados na Fazenda Reunidas Sococo, que pertence a SOCOCO S/A agroindústrias da Amazônia localizada no município de Santa Isabel, Pará. As amostras foram levadas para laboratório e realizados isolamentos direto, onde as amostras foram desinfestadas com álcool a 70%, hipoclorito a 2% seguido de enxágue com água estéril. Após este processo, as amostras foram colocadas em câmara úmida, caixas do tipo Gerbox, forradas com papel filtro estéril e umedecidos com água estéril, por 24 horas. Amostras de micélio foram coletados e cultivados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), e mantidos em temperatura de 25ºC, até ser observado o crescimento micelial das colônias (BARNET; HUNTER, 1972). Foram confeccionadas lâminas semipermanentes para identificação até gênero com auxílio de microscópio Olympus X21.

**2.3 Antagonismo:Pareamento**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, sendo quatro isolados de *Trichoderma* *asperellum* (T06, T09, T12 e T52) pertencentes a coleção de microrganismos do LPP e tratamento controle apenas com *Thielaviopsis* sp., e quatro repetições. Foram utilizadas placas de Petri, esterilizadas na câmara de fluxo, contendo meio de cultura BDA. Discos de micélio (Ø=5 mm) de *Thielaviopsis* sp foram colocados em um lado das placas de Petri e no lado oposto da mesma placa foi colocado disco de micélio (Ø=5 mm) de *T. asperellum,* equidistantes ao disco de micélio do patógeno. As placas foram mantidas em uma bancada em temperatura ambiente (25oC) e sob fotoperíodo de 12 horas, para serem avaliadas.

**2.4 Avaliações**

As avaliações foram realizadas após 24h após a disposição do experimento, foram realizadas através de medições diárias dos diâmetros da colônia de *Thielaviopsis* sp utilizando uma régua milimetrada, durante cinco dias. Os dados coletados durante a avaliação foram utilizados para calcular o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), dada pela formula IVMC = D–Da/N adaptada de Oliveira (1991), onde D é igual ao diâmetro atual da colônia, Da é o diâmetro do dia anterior e N é o número de dias após o início do experimento. Também foi avaliada a porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Thielaviopsis sp* em relação ao tratamento controle, proposto por Ezziyyani *et al*., (2004) segundo a formula PICR = R1–R2/R1 onde o PICR= % de inibição de crescimento micelial, R1=Raio do tratamento controle e R2= Raio do tratamento.

**2.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos apresentaram distribuição normal e foram submetidos à Análise de Variância e suas médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) (p-valor≤0,05), utilizando-se o programa Rx65 3.5.1. (CRAN, 2018).

**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os isolados de *T. asperellum* T06, T09, T12 e T52 foram antagônicos ao crescimento micelial de *T. paradoxa* alcançado crescimento de 1,41, 1,4, 1,43 e 1,49 cm, respectivamente, enquanto o controle atingiu 2,05cm (Figura 1).

**Figura 1**- Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM). IVCM de *T. asperellum* sobre *Thielaviopsis sp* (A) e placas de Petri com colônias equidistantes em teste de pareamento (B). \*Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Student-Newman-Keuls (SNK) (p ≤ 0,05).

 

(B)

(A)

Fonte: os autores

De acordo com a tabela 1, podemos observar que a taxa percentual média de inibição de crescimento radial (PICR) destaca os isolados T09 e T52 que reduziram em 23,6 e 21,71% o PICR, respectivamente.

**Tabela 1**. Percentual médio de inibição do crescimento radial (PICR) de isolados de *T.asperellum* sobreisolados de *Thielaviopsis* sp*.\*M*édias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) (p ≤ 0,05).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|

|  |
| --- |
| **Isolados de** *T. asperellum* |

 | **PIRC%** |
| **T06** | 19,53 bc |
| **T09** | 23,59 a |
| **T12**  | 18,59 c |
| **T52** | 21,71 ab |
| **CV (%)** |  10,02 |

Fonte: os autores

 Os resultados deste trabalho concordam com outros descritos na literatura e reafirmam a capacidade de fungos do gênero *Trichoderma* em inibir o crescimento de fitopatógenos. A ação antagônica dos isolados de *T. asperellum* pode ser justificada pela capacidade parasítica do fungo de aglomerar hifas sobre o patógeno (SANTOS *et al.*, 2012), ou ainda segundo Bomfim *et al.* (2010) por produzir metabólitos voláteis ocasionando uma inibição no desenvolvimento micelial do fitopatógeno configurando antibiose, apresnetando também como possibilidade a competição por nutrientes (BENHAMOU; CHET 1996), ao comparar pareamentos realizados contra outros patógenos podemos evidenciar a eficiencia do fungo por suas capacidades antagônicas, tal como em BONETT *et al.* (2013) no qual obteve-se inibição de crescimento de 57,50% e 43,61% com isolados de *T.viride* e *T.virens*, respectivamente, sobre o fitopatogeno *Colletotrichum musae* e o realizado por MARTIN e MELO (1998) contra *Verticillium dahliae*, no qual obtiveram inibição total do crescimento do patógeno através dos isolados de *Trichoderma* sp. selecionados, no qual constataram a capacidade dos mesmos de colonizar em seu hospedeiro,formando estruturas similares a ganchos,ocasionando a destruição da parede celular de seu competidor para obter nutrientes.

**4. CONCLUSÃO**

Os estudos de controle biológico da resinose do coqueiro devem avançar para a casa de vegetação para que seja possível avaliar a redução da severidade desta doença com utilização dos isolados de *T. asperellum.*

**5.AGRADECIMENTOS**

 Á Universidade Federal da Amazônia, ao Laboratório de Proteção de Plantas, a Fazenda Reunidas Sococo (SOCOCO Agroindústria da Amazônia) e FAPESPA.

**REFERÊNCIAS**

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing, 241 p.1972.

BENHAMOU, N. & CHET, I. 1996. Parasitism de Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology  86**, 405-416

Bomfim, M.P.; São José, A.R.; Rebouças, T.N.H.; Almeida, S.S.; Souza, I.V.B.; Dias, N.O. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica,** v.36, n.1, p.61-67,0100-5405, 2010.

BONETT,L.P.; HURMANN,E.M.S.;JÚNIOR,M.C.P;ROSA,T.B.;SOARES,J.L. Biocontrole *in Vitro* de *Colletotrichum musae* por isolados de *Trichoderma* spp. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 5-10, Dez. 2013.

CRAN, disponível em:<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/> acesso em 02 de novembro de 2018.

EZZIYYANI, M.; PÉREZ, S. C.; REQUENA, M. E.; RUBIO, L.; CANDELA, M. E. Biocontrol por *Streptomyces rochei* (Ziyani), de la podre dumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. **Anales de Biología**, n.26, p.69-78, 2004.

Fortes, F. O.; Silva, A. C. F.; Almança, M. A. K.; Tedesco, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp**.** **Revista Árvore**, vol. 31, núm. 2, março-abril, 2007, pp. 221-228.

FREITAS,S. S.; VILDOSO, C. I. A.. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28:987-994, 2004.

MARIANO, R. L. R. Doenças do Coqueiro **(***Cocos nucifera* **L.)**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; FILHO, A. B.; CAMARGO L.E.A.; REZENDE, J.A.M (Ed.). **Manual de Fitopatologia.** v.2: Doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo. Editora Agronômica Ceres, cap.4, p.18-25. 1997.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. de. ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma spp.* A *Verticillium dahliae* KLEB.**Sci. agric.**, Piracicaba ,  v. 55, n. 1, p. 1-7,  Jan.  1998

Martins, C.R.; JÚNIOR, L.A. J. Produção e Comercialização de Coco no Brasil Frente ao Comércio Internacional: Panorama 2014. **Documentos/Embrapa Tabuleiros Costeiros**,1678-1953*,* 2014.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.), p. 111, 1991. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – **Escola Superior de Agricultura de Lavra**s, Lavras, 1991.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 280-293. 1985.

SANTOS, C. C.; Oliveira, F. A.; dos Santos, M. S.; Talamini, V.; Ferreira , J. M. S.; dos Santos, F. J. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **Scientia Plena** **8**, 047309, 2012.

Warwick,D.R.N.;Passos ,E.E.M. Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil ;**Tropical Plant Pathology**, vol.34 no.3 Brasília May/June 2009 ISSN 1982-5676.