



## INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Trichoderma harzianum* POR FERTILIZANTES LÍQUIDOS

Helder Ivo Pandolfi Marques<sup>1</sup>, Marcelo Barreto da Silva<sup>2</sup>, Maria Davina Pandolfi Marques<sup>3</sup>, Ribamar Castro Rodrigues<sup>1</sup>, Paulo Roberto Cleyton de Castro Ribeiro<sup>1</sup>

1. Mestrando em Agricultura Tropical, pela Universidade Federal do Espírito Santo – CEUNES-UFES, São Mateus - ES, Brasil, (helderivo@hotmail.com)
2. Professor Doutor da Universidade Federal do Espírito Santo – CEUNES-UFES, São Mateus - ES, Brasil.
3. Especialista em Língua Portuguesa pelas Faculdades Integradas de São Gonçalo, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

### RESUMO

O agente de controle biológico *Trichoderma spp.* é eficiente no controle de vários patógenos de plantas, mas sua eficiência pode variar com umidade do solo, tipo de cultivo, disponibilidade de nutriente, pH, temperatura, concentração de ferro entre outros fatores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento in vitro de *Trichoderma harzianum* em meio de cultura BDA com os produtos Fertiactyl Gz®, Polycana® e Torped® em concentrações de 25%, 50%, 100%, 150% e 200% onde 100% é a concentração recomendada do produto na região de São Mateus – ES. Como o pH dos produtos são variados, avalio-se também o efeito do pH no crescimento do *T. harzianum*. O fungo foi cultivado em BOD a 28°C por 4 dias. Fertiactyl Gz® e Polycana® inibiram o crescimento do fungo em doses acima de 25%. O Torped® inibiu o crescimento micelial a partir da dose acima de 50% da recomendada na região. O fungo apresentou melhor taxa de desenvolvimento em pH 4. A interferência negativa dos produtos testados pode estar relacionada com a presença de elementos, com efeito, fungistático nos produtos ou devido ao pH dos produtos. O crescimento micelial foi inibido pelos produtos testados. No entanto, Torped® em doses menores não teve efeito inibitório, podendo aumentar o crescimento do *T. harzianum*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle Biológico, fito toxidez, *Trichoderma harzianum*.

### INHIBITION OF MYCELIAL GROWTH OF *Trichoderma harzianum* FOR LIQUID FERTILIZERS

#### ABSTRACT

The biological control agent *Trichoderma spp.* is efficient in the control of several pathogens of plants, but its efficiency may vary with soil moisture, crop type, nutrient availability, pH, temperature, concentration of iron among other factors. The aim of this study was to evaluate the in vitro growth of *Trichoderma harzianum* in BDA culture medium with Fertiactyl Gz products ®, Polycana ® and Torped ® at concentrations of 25%, 50%, 100%, 150% and 200%, where 100% is the recommended product concentration in the region of São Mateus-ES. As the pH of the products are varied, evaluate the effect of pH on the growth of *T. harzianum*. The fungus was grown in BOD to 28° C for 4 days. Gz Fertiactyl ® and Polycana ®

inhibited the growth of the fungus in doses above 25%. The Torped ® inhibited the Mycelial growth from the dose above 50% of the recommended in the region. The fungus showed better rate of development at pH 4. Negative interference of the products tested may be related to the presence of elements, in fact, fungistatico in products or due to the pH of the products. The Mycelial growth was inhibited by tested products. However, Torped ® in smaller doses had no inhibitory effect, and may increase the growth of *T. harzianum*.

**KEYWORDS:** Biological Control, fitotoxidês, *Trichoderma harzianum*.

## INTRODUÇÃO

O *Trichoderma harzianum* Rifai (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) é um fungo filamentosos, assexuais, parasita facultativo de outros fungos (SAMUELS, 2006). Esse fungo ocorre em praticamente todos os tipos de solos tropicais, utilizando substratos orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio em ecossistemas rizosféricos.

*Trichoderma harzianum* é amplamente utilizado no controle biológico de patógenos de plantas como *Pythium* spp., (MONTERO-BARRIENTOS et al., 2011; PANDEY et al., 2010), *Rhizoctonia solani* (PANDEY et al., 2010), *Phytophthora* spp., (ROBERTS et al., 2010), *Crinipellis perniciososa* (SONOGO et al., 2002), *Fusarium* spp., (YANG et al., 2010), *Alternaria alternata* (SEMPERE & SANTAMARINA, 2007) entre outros. No entanto, sua eficiência no controle desses fitopatógenos pode variar de acordo com os seguintes fatores: a espécie de *Trichoderma* spp., o fungo que antagoniza, a umidade do solo, o tipo de cultivo, a disponibilidade de nutriente, o pH, a temperatura e a concentração de ferro.

Segundo MACHADO et al., (2012) o fungo *Trichoderma* spp., apresenta efeito sobre as culturas aumentando a frequência e desenvolvimento das raízes, a produtividade, resistência a estresses abióticos, absorção e utilização de nutrientes. Em muitos casos, essas respostas ocorrem pela diminuição da atividade da microflora da raiz, inativação de compostos tóxicos na rizosfera, aumento na eficiência do uso do nitrogênio e solubilização de nutrientes no solo.

No entanto, a germinação de conídios ou clamidósporos de *Trichoderma* spp., é vulnerável a fungistasi do solo. Os esporos do fungo *Trichoderma* spp., quando introduzidos no solo podem lisar antes da germinação e crescimento. Isso pode ocorrer devido à indisponibilidade de contínuo fornecimento de nutrientes, o que limita o uso desse agente biológico no controle de doenças do solo. Por outro lado, matéria orgânica e nutrientes adicionados ao solo juntamente com *Trichoderma* spp., podem manter o fungo em um estado viável e atingir melhor eficácia de controle biológico (YANG et al., 2010).

Fertilizantes na forma líquida são utilizados em diferentes estágios fenológicos da planta via fertirrigação por gotejamento, aspersão e outras formas de aplicação, principalmente como fonte de macro e micronutrientes. Também é uma prática regular na região de São Mateus – ES a mistura de tanque de fertilizantes com formulações de *T. harzianum* no controle da fusariose em *Piper nigrum* L., (pimentado-reino), doença provocada por *Fusarium solani* f. sp. piperis. Com isto, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de fertilizantes líquidos sobre o crescimento in vitro do *Trichoderma harzianum*.

## MATERIAL E METODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Fitopatologia do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, CUENES - UFES em São Mateus – ES. Para o isolamento

e armazenamento, uma alíquota do produto comercial contendo *T. harzianum* (Trichodermil®, Itaforte, Itapetinga – SP, Brasil) foi aplicada em placas de Petri contendo meio de cultura, batata, dextrose, agar (BDA) e incubadas por 5 dias a 28°C no escuro em BOD. Exames em microscópio de luz foram realizados para confirmar o crescimento da colônia de *Trichoderma* de acordo com microestruturas de reprodução desenvolvidas por este fungo (SAMUELS, et al. 2011).

Medições do pH dos produtos Fertiactyl GZ®, Polycana® e Torped® puros, diluídos em água destilada e em meio BDA nas concentrações recomendadas para o uso no campo foram feita em pHmetro modelo Marconi PA 200 digital. Para o teste de crescimento do fungo em diferentes pH foi utilizado meio BDA, com ajuste do pH feito com HCl 0,1M e KOH 0,1M. Os valores de pH do meio foram ajustados para 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0, antes da autoclagem. Após, o meio foi vertido em placas de Petri. Posteriormente, discos de micélio de *Trichoderma harzianum* foram colocados no centro da placa. Essas placas ficaram em BOD, a 28°C no escuro para cultivo. Após quatro dias, medidas do crescimento micelial de *T. harzianum* foram aferidas com uma régua milimetrada. Para cada pH, três repetições foram realizadas.

Alíquotas dos fertilizantes: 1 - Fertiactyl Gz® (Timac Agro, Porto Alegre, RS, Brasil); 2 - Torped® (Oxiquímica, Jaboticabal, SP, Brasil); 3 - Polycana® (Magrisa, Zaragosa, Espanha) foram diluídas em 30 mL de meio BDA para cada concentração em triplicata de acordo com a (Tabela 1). Discos de meio BDA contendo micélio e conidio de *Trichoderm harzianum* de 0,7 cm de diâmetro foram colocados no centro de cada placa. As placas foram vedadas com parafilme e colocadas em BOD, a 28°C no escuro. A medida do diâmetro das colônias foi efetuada três dias depois com régua milimetrada em um único sentido.

**TABELA 1.** Concentrações utilizadas dos produtos Fertiactyl Gz®, polycana® e torped®.

Produto	Concentrações (ml/L)				
Fertiactyl Gz	10(25%)	20(50%)	40*	60(150%)	80(200%)
Torped	25(25%)	50(50%)	100*	150(150%)	200(200%)
Polycana	25(25%)	50(50%)	100*	150(150%)	200(200%)

\* Concentração usada por agricultores em mistura de tanque na região.

O cálculo da porcentagem de redução de crescimento das colônias (RC%) foi realizado pela fórmula:  $RC\% = \frac{DT - CTF}{DT} \times 100$ , em que DT é o diâmetro da testemunha (cm) e CTF é o total de crescimento da colônia (cm).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e os que apresentaram significância foram comparados por meio teste de Tukey (P=0,05) e por regressão linear simples.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

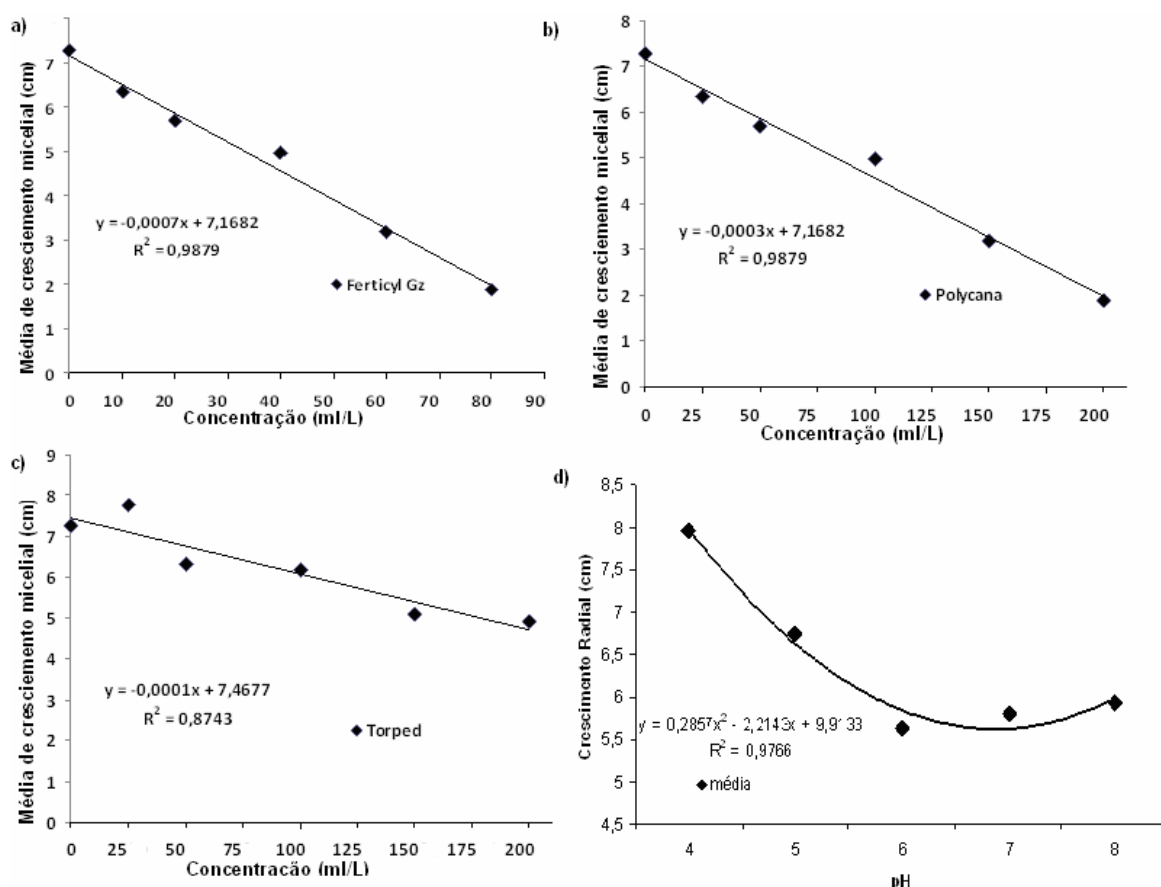
Entre os produtos testados o pH do Torped® foi o mais ácido. Polycana® e Fertiactyl Gz ® são produtos básicos (Tabela 2). O pH do BDA é 5,5, a adição dos produtos, provoca alteração do pH do BDA, acidificando-o ou tornando-o básico. Quando o *T. harzianum* foi incubado em diferentes faixas de pH, apresentou maior crescimento em meio acidificado (Figura 1). Valores ótimos de pH para o crescimento de *T. harzianum* são observados em meio acidificado, mas o fungo tem capacidade de crescer em todas os valores de pH (GARCÍA et al., 2003). A diferença no pH dos produtos pode ser o fator que levou ao menor efeito inibitório do

Torped®, produto mais ácido que Polycana® e Fertiactyl Gz®. Resultado coerente no aspecto negativo, tendo em vista que o Polycana® é o produto mais alcalino e teve maior efeito inibitório sobre o crescimento do *Trichoderma harzianum*.

**TABELA 2.** Valores de pH dos produtos utilizados.

Produto	Sem diluição (Puro)	Diluído em água destilada*	Diluído em Meio BDA*
Fertiactyl Gz	02,48	02,24	01,07
Torped	11,10	11,39	12,58
Polycana	09,43	09,43	09,43

\* Utilizando a concentração usada por agricultores.



**FIGURA 1.** Curva de crescimento micelial de *Trichoderma harzianum*, em função de diferentes concentrações de Fertiactyl Gz®, Polycana®, Torped® e pH em meio BDA.

Aumento nas concentrações dos produtos provocou a diminuição no crescimento radial das colônias de *T. harzianum* quando comparado com a testemunha. Fertiactyl Gz® e Polycana® causaram inibição no crescimento do *T. harzianum* logo na concentração inicial, que foi de 10 e 25 ml/L respectivamente (Tabela 3).

No entanto, Torped® estatisticamente não inibiu o crescimento quando utilizado 25% da dose recomendada. Ainda apresentou media de crescimento maior

em relação à testemunha. Quando utilizado 50% da dose recomendada pelo fabricante os três produtos testados tiveram efeito inibitório sobre o crescimento do *T. harzianum* (Tabela 3). Polycana® apresentou maior efeito inibitório 21,49%, Torped® e Fertiactyl Gz® não apresentaram diferença estatística no efeito inibitório. Trabalho conduzido por DLUZNIEWSKA (2008) mostrou que o zinco, presente na composição do Torped, tem efeito inibitório no crescimento micelial e na germinação dos esporos de *Trichoderma* spp., quando utilizado 10 e 30 ml/L. Enquanto que em concentrações mais baixas este metal estimulou o crescimento de *T. harzianum*. Alguns microelementos que são componentes dos fertilizantes foliares possuem efeito fungistático. Trata-se particularmente de enxofre, cobre, zinco, estanho, fósforo e manganês (SZEWCZUK & MICHALOJC, 2003).

**TABELA 3.** Médias do crescimento micelial e percentagem de inibição de *Trichoderma harzianum*, utilizando 25% e 50% da concentração recomendada.

Tratamentos	Crescimento micelial (cm)		Inibição (%)	
	25%	50%	25%	50%
Testemunha	7,26ab	7,26a	0	0
Torped®	7,76a	6,33bc	0	12,80
Fertiactyl Gz®	7,16b	6,43b	1,37	11,43
Polycana®	6,33c	5,7c	12,80	21,49

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O efeito inibitório sobre o crescimento do *T. harzianum* depende da concentração de cada elemento. Porém eles são necessários para o crescimento dos fungos (DLUZNIEWSKA, 2008). A pesquisa realizada revelou que os fertilizantes foliares causam alterações no desenvolvimento *T. harzianum*.

Dentre os adubos estudados, Polycana® provou ser mais desfavorável para *T. harzianum*, uma vez que mais inibiu o crescimento micelial. Fertycil Gz® e Torped® também apresentaram efeito inibitório, porém menor. No caso do Torped®, houve aumento na taxa de crescimento micelial de *T. Harzianum* utilizando 25 % da dose recomendada na região. Essa concentração pode ser aplicada juntamente com *T. harzianum*. No entanto, Polycana® e FertiactylGz® não são recomendados em mistura de tanque com *T. harzianum*. Mistura de tanque é uma prática perigosa e carece de mais estudos para saber quais e em que condições são recomendadas.

### CONCLUSÃO

A mistura de tanque é uma pratica perigosa e carece de mais estudos para saber quais e em que condições são recomendadas. A mistura de Polycana® ou FertiactylGz® não é recomendada em mistura de tanque com *T. harzianum*.

Torped® em concentração menor que a recomendada na região pode ser aplicada juntamente com produtos contendo *T. harzianum*.

### REFERÊNCIAS

DLUZNIEWSKA, J. The effect of foliar fertilizers on the development and activity of *Trichoderma* spp. **Polish Journal of Environmental Studies**. Stud, v.17, n.6, p. 869-874, 2008.

GARCÍA, R. A. M.; G. HOOPEN, M.; KASS, D. C. J.; GARITA, V. A. S. KRAUSS, U. Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of Rosellinia root rot in cocoa. **Biological Control**, v. 27, p. 210-227, 2003.

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.

MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; GUTIERREZ, S.; MONTE, E. Functional Analysis of the *Trichoderma harzianum* nox1 Gene, Encoding na NADPH Oxidase, Relates Production of Reactive Oxygen Species to Specific Biocontrol Activity against *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p. 3009-3016, 2011.

PANDEY, A.; SIMON, L. S.; AHMAD, S. Screening of antifungal activities in *Trichoderma* isolates against some soil borne plant pathogens. **National Academy Science Letters-india**, v.33, p. 285-288, 2010.

ROBERTS, D. P.; MAUL, J. E.; MCKENNA, L. F.; EMCHE, S. E.; MEYER, S. L. F.; COLLINS, R. T.; BOWERS, J. H. Selection of genetically diverse *Trichoderma* spp. isolates for suppression of *Phytophthora capsici* on bell pepper. **Canadian Journal of Microbiology**, v.56, n.10, p. 864-873, 2010.

SAMUELS, J. G. *Trichoderma*: systematics, the Sexual State and Ecology. **Phytopathology**, v.96, n.2, p. 195-206, 2006.

SAMUELS, G. L.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory**. ARS, USDA, 2011. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>> Acesso em: 20 de fevereiro de 2011.

SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M. P. In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. **Mycopathologia**, v.163, p. 183–190, 2007.

SONOGO, S.; POMELLA, P. K.; HEBBAR, P. K.; BAILEY, B. A.; COSTA, J. C.; SAMUELS, G. J.; LUMSDEN, R. D. Production and germination of conidia by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis perniciososa* on cacao. **Phytopathology**, v.92, n.10, p.1032-1037, 2002.

SZEWCZUK, C.; MICHALOJC, Z. Practical aspects of foliar fertilization. **Acta Agrophys**. v.19, p.85, 2003.

YANG, X.; CHEN, L.; YONG, X.; SHEN, Q. Formulations can affect rhizosphere colonization and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 against *Fusarium* wilt of cucumbers. **Biology and Fertility of Soils**, v.47, p. 239–248, 2010.