



Avaliação de Isolados de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium virens* na Promoção de Crescimento em Mudanças de Eucalipto e na Produção de Ácido Indolacético *In Vitro*

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 232

**Avaliação de Isolados de *Trichoderma*
spp. e *Gliocladium virens* na
Promoção de Crescimento em Mudanças
de Eucalipto e na Produção de Ácido
Indolacético *In Vitro***

R. P. Santos

M. R. Carvalho Filho

I. Martins,

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros:
Diva Maria de Alencar Dusi
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes:
João Batista Tavares da Silva
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Foto da capa: Promoção de crescimento da raiz de muda clonal de eucalipto em substrato tratado com *Trichoderma harzianum* (CEN 522), e com aspersões adicionais do agente de biocontrole.

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 945 Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium virens* na promoção de crescimento em mudas de eucalipto e na produção de ácido indolacético *in vitro*. / R. P. Santos... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 232).

1. *Trichoderma*. 2. Eucalipto. 3. Muda. I. Santos, R. P. de. II. Série.

634.97342 – CDD 21

Sumário

| | |
|-------------------------------------|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract | 6 |
| Introdução | 7 |
| Materiais e Métodos | 7 |
| Resultados e Discussão | 9 |
| Conclusão | 12 |
| Referências | 12 |

Avaliação de Isolados de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium virens* na Promoção de Crescimento em Mudanças de Eucalipto e na Produção de Ácido Indolacético *In Vitro*

Santos, R.P.¹;
Carvalho Filho, M.R.²;
Martins, I.³;
Mello, S.C.M.⁴
Menêzes, J.E.⁵

Resumo

A propagação vegetativa por meio de estaquia constitui a principal forma de multiplicação do eucalipto em escala comercial. Espécies de *Eucalyptus* sofrem o ataque, principalmente, de fungos. Procurou-se avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. e de *Gliocladium virens*, como promotores de crescimento em mudas clonais de eucalipto e a produção de ácido indolacético. Para a promoção de crescimento em mudas clonais de eucalipto, foram adicionados 100 mL da suspensão aquosa (10^7 conídios/mL) a 30 kg de substrato (casca de arroz carbonizada e vermiculita + fertilizante químico). Aos tubetes, preenchidos com esse mistura, foi colocada uma estaca de eucalipto (G-100). Após o enraizamento e aclimatação, as mudas foram transferidas para canteiros a céu aberto, recebendo três aplicações foliares com suspensões de *Trichoderma* spp. (10^7 conídios/mL), a cada 21 dias. Os isolados CEN 500, CEN 501, CEN 502, CEN 503, CEN 504, CEN 511, CEN 513 e CEN 522, que mais se destacaram nesse experimento, foram testados quanto à produção de ácido indolacético. Destacam-se como promotores de crescimento da raiz (CEN 513 e CEN 522) e da parte aérea (CEN 502, CEN 503 e CEN 504). Nenhum isolado de biocontrole produz AIA.

Termos para indexação: *Trichoderma*, *Gliocladium virens*, promoção de crescimento, eucalipto, ácido indolacético.

¹ Agronomia, graduando, Universidade de Brasília - UnB

² Biólogo, doutorando, Universidade de Brasília - UnB

³ Bióloga, Ms.C., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Eng.Agr., MsC. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

The vegetative propagation for stake is the principally form the multiplication of the eucalyptus plants in scale commercial. Eucalyptus species have suffer, principally, for fungus. Evaluation the potential the isolates the *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*, as development promotions the clone the eucalyptus and production indolacetic acid. For growth promotion of clone the eucalyptus, was added 100 mL the aqueous suspension (10^7 conidios/mL) of 30 kg the substract (rice of rusk carbonized and vermiculite plus chemical fertilization). The "tubetes" was fulfilled with mix, and planted with stake the eucalyptus (G-100). After enrooting and acclimation, the plants was transferred of sky open. This was received three revel applications with suspension of *Trichoderma* spp. (10^7 conidios/mL), after 21 days. The CEN 500, CEN 501, CEN 502, CEN 503, CEN 504, CEN 511, CEN 513 e CEN 522 segregate that was the best in experiments, was tested with indolacetic acid. Detaching in root growth promoters (CEN 513 e CEN 522) and in aerial parts (CEN 502, CEN 503 e CEN 504). None isolate of biocontrol produce indolacetic acid.

Index terms: *Trichoderma*, *Gliocladium virens*, growth promotion, eucalyptus, indolacetic acid.

Introdução

A propagação vegetativa por meio de estaquia constitui a principal forma de multiplicação do eucalipto (*Eucalyptus*) em escala comercial (HIGASHI et al., 2000). A clonagem de genótipos promissores vem possibilitando um considerável avanço na silvicultura intensiva dessa espécie no Brasil (SANTOS, 1994).

Espécies do gênero *Eucalyptus*, constantemente sofrem o ataque dos mais variados patógenos, principalmente dos fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos, ocorrendo nos mais variados locais, espécies e épocas do ano (SANTOS et al., 2001).

Espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Gliocladium* são fungos de vida livre altamente interativos na raiz, solo e ambientes foliares. São conhecidos por produzir uma larga escala de antibióticos e parasitar outros fungos. Também podem competir com outros microorganismos por exsudados da semente, mas principalmente por nutrientes e/ou espaço (HARMAN et al., 2004). São capazes de promover o crescimento de plantas e aumento da produtividade, além de solubilizar micronutrientes insolúveis do solo, influenciar no pH do solo e na microflora (ALTOMARE et al., 1999). A promoção de crescimento é devido à solubilização de fosfato e micronutrientes do solo (RANASINGH et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de 15 isolados de *Trichoderma* spp. e dois isolados de *Gliocladium virens* como promotor de crescimento em mudas clonais de eucalipto e avaliar *in vitro*, a produção de ácido indolacético (AIA).

Materiais e Métodos

Obtenção de inóculo de *Trichoderma* e *Gliocladium* para os testes *in vivo*

Dezessete isolados dos agentes de biocontrole foram utilizados para os experimentos *in vivo*. Esses antagonistas fazem parte da Coleção de Culturas de Fungos para o Controle de Fitopatógenos e de Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

Grãos de arroz umedecidos com água destilada (30 mL) a 60% (p/v) foram colocados em Erlenmeyers (50 g de arroz seco/frasco), vedados com tampões de algodão e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Após o processo de esterilização, cada Erlenmeyer recebeu assepticamente cinco discos de 5 mm de diâmetro retirados das colônias de *Trichoderma* e *Gliocladium* em meio BDA com cinco dias de incubação a 25°C em fotoperíodo de 12h. Após esse processo, foram incubados em câmara do tipo B.O.D. nas mesmas condições descritas anteriormente. Os Erlenmeyers foram agitados de dois em dois dias para descompactar o arroz e aumentar a taxa de esporulação. Após 7 dias de crescimento, os

grãos colonizados foram lavados com água e peneirados para retirar a parte sólida, utilizando-se a solução dos conídios. A concentração de conídios na solução foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada a 10^7 conídios/mL de suspensão. O experimento para avaliação da promoção de crescimento em mudas clonais de eucalipto foi realizado em um viveiro comercial do município de Luziânia (GO). 100 mL da suspensão aquosa (10^7 conídios/mL) foram adicionados em 30 kg de substrato, que é composto de uma parte de casca de arroz carbonizada e outra parte de vermiculita, acrescido de fertilizante químico (45 g de Osmocote), posteriormente homogeneizados em misturador do tipo betoneira. Os tubetes foram preenchidos com esse substrato.

Em cada tubete foi colocada uma estaca do clone híbrido de eucalipto G-100 (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*). Os tubetes foram para a fase de enraizamento, na casa de vegetação dotada de controle de temperatura e umidade. Após o período de enraizamento e aclimação, aos 30 dias de idade, as mudas foram transferidas para canteiros a céu aberto, recebendo três aplicações foliares com suspensões de *Trichoderma* (10^7 conídios/mL), com intervalo de 21 dias.

Ao final do período de 95 dias as amostras foram coletadas inteiramente ao acaso e acondicionadas em sacos de papel. As raízes foram separadas na região do colo e lavadas em água corrente, os sacos contendo as devidas partes das plantas foram secos em estufa (70°C) tomando-se os valores de massa seca após secagem por 48 horas. Em laboratório, as plantas foram avaliadas quanto ao peso seco das raízes e parte aérea. Utilizaram-se seis repetições de cada isolado sendo que cada repetição foi composta por três partes da planta por saco.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com 2 repetições, sendo que cada repetição foi composta por uma bandeja contendo 214 mudas de eucalipto e amostradas entre todas as plantas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa de estatística SISVAR (FERREIRA, 2000).

Produção de Ácido Indolacético por isolados de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium virens*

Os isolados dos agentes de biocontrole utilizados nos experimentos de promoção de crescimento que mais se destacaram no ensaio anterior (CEN 500, CEN 501, CEN 502, CEN 503, CEN 504, CEN 511, CEN 513 e CEN 522) foram testados quanto à produção de ácido indolacético *in vitro*, individualmente, utilizando-se três meios líquidos para cultivo: BD (Batata Dextrose), aveia e extrato de carne-peptona. Para cada isolado foram preparadas três repetições (Erlenmeyers). Os isolados foram transferidos para frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio, utilizaram-se cinco discos de 5 mm de diâmetro retirados da zona de crescimento de colônias com cinco dias de idade para incorporação

em cada meio. Os frascos foram colocados em estufas incubadoras, com agitação a 150 rpm à 25°C durante sete dias. Após esse período, a parte líquida foi coletada por filtragem a vácuo, utilizando papel de filtro (14 μm). Foi tomada uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, a qual se adicionaram 2 mL de solução de Salkowski (150 mL de HClO_4 , 250 mL de água destilada e 7,5 mL de 0,5 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Para confecção da curva padrão utilizou-se uma solução de AIA na proporção de 1mgAIA / 1 mL H_2O e preparada às concentrações de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Curva padrão de calibração do AIA.

| Quant. (mg) | AIA (μL) | H_2O (μL) | Reagente (μL) | Total (μL) |
|-------------|-----------------------|----------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 1000 | 2000 | 3000 |
| 10 | 10 | 990 | 2000 | 3000 |
| 20 | 20 | 980 | 2000 | 3000 |
| 30 | 30 | 970 | 2000 | 3000 |
| 40 | 40 | 960 | 2000 | 3000 |
| 100 | 100 | 900 | 2000 | 3000 |

Foi utilizado um controle negativo: tubo de ensaio contendo 1 mL do filtrado e 2 mL de água destilada. Os tubos de ensaio contendo as soluções foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos antes das leituras.

A produção de AIA foi determinada em espectrofotômetro, com absorvância de 535 nm (GRAVEL et al., 2007), sendo os valores subtraídos do controle negativo e comparados com a curva padrão, que possui linha de regressão (Absorvância = $0,0047x + 0,211$)

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da promoção de crescimento pelos isolados de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium virens* estão apresentados na Tabela 2. Dois isolados (CEN 513 e CEN 522) se destacaram como promotores de crescimento da raiz (Figura 1) e três isolados (CEN 502, CEN 503 e CEN 504), da parte aérea (Figura 2).

Tabela 2 – Peso médio e classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium virens* quanto à promoção de crescimento de mudas clonais de eucalipto⁽¹⁾.

| Isolados | Peso médio de três raízes (g) | Aumento % | Peso médio três partes aéreas (g) | Aumento % |
|----------|-------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| CEN 500 | 1,05 ab | 61,5 | 3,52 ab | 43,5 |
| CEN 501 | 0,93 abc | 43,6 | 3,42 ab | 39,5 |
| CEN 502 | 1,05 ab | 61,5 | 3,63 a | 48,3 |
| CEN 503 | 1,00 abc | 53,8 | 3,78 a | 54,4 |
| CEN 504 | 1,05 ab | 61,5 | 3,67 a | 49,7 |
| CEN 505 | 0,88 abc | 35,9 | 3,08 abc | 25,9 |

| Isolados | Peso médio de três raízes (g) | Aumento % | Peso médio três partes aéreas (g) | Aumento % |
|------------|-------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| CEN 506 | 1,03 abc | 59,0 | 3,23 ab | 32,0 |
| CEN 507 | 1,03 abc | 59,0 | 3,25 ab | 32,7 |
| CEN 508 | 0,93 abc | 43,6 | 3,12 ab | 27,2 |
| CEN 509 | 1,00 abc | 53,8 | 3,18 ab | 29,9 |
| CEN 510 | 0,80 abc | 23,1 | 3,10 abc | 26,5 |
| CEN 511 | 1,12 ab | 71,8 | 3,35 ab | 36,7 |
| CEN 512 | 0,53 c | -17,9 | 2,03 c | -17,0 |
| CEN 513 | 1,20 a | 84,6 | 3,55 ab | 44,9 |
| CEN 514 | 1,03 abc | 59,0 | 3,55 ab | 44,9 |
| CEN 521 | 0,97 abc | 48,7 | 2,88 abc | 17,7 |
| CEN 522 | 1,17 a | 79,5 | 3,48 ab | 42,2 |
| Testemunha | 0,65 bc | 0,0 | 2,45 bc | 0,0 |
| C.V. | 25,25 | | 15,92 | |

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 1 – Promoção de crescimento da raiz de muda clonal de eucalipto em substrato tratado com *Trichoderma harzianum* (CEN 522), e com aspersões adicionais do agente de biocontrole.



Figura 2 – Promoção de crescimento da parte aérea de muda clonal de eucalipto em substrato tratado com *Trichoderma harzianum* (CEN 503) e com aspersões adicionais do agente de biocontrole.

Esses resultados obtidos na promoção de crescimento em mudas de eucalipto, mostram variabilidade entre isolados dos gêneros *Trichoderma* e *Gliocladium* quanto à eficiência em promover ganhos significativos de matéria seca em mudas de eucalipto. Fortes et al. (2007) trabalhando com *Trichoderma* spp. obteve aumento significativo na porcentagem de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus*. Resende et al. (2004) trabalhando com promoção de crescimento de milho obteve aumento significativo no acúmulo de matéria seca em sementes inoculadas com *Trichoderma harzianum*. Os resultados obtidos neste trabalho se assemelham com dados obtidos por diferentes autores, caracterizando o potencial uso agrícola desses agentes de biocontrole. Com a leitura da curva padrão do AIA (Figura 3) foi feita a linha de regressão ($\text{Absorbância} = 0,0047x + 0,211$) e determinou-se a produção do hormônio por cada isolado testado. Os isolados de *Trichoderma* que apresentaram maiores níveis de promoção de crescimento, ao serem testados quanto à produção de AIA, não apresentaram resultado positivo, em nenhum dos três meios de cultura utilizados.

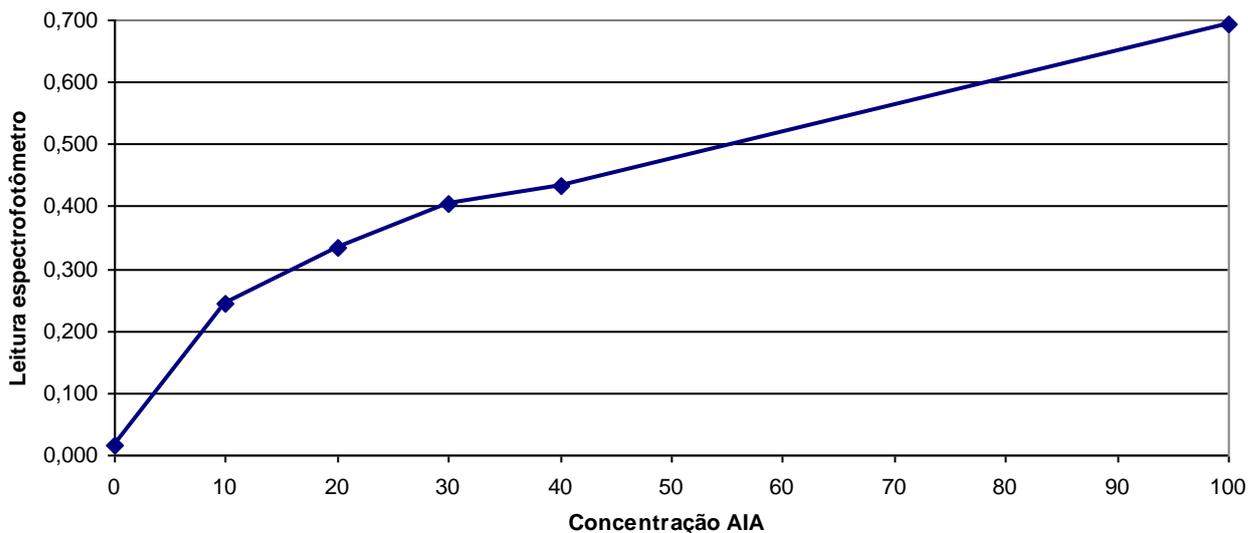


Figura 3 – Leitura da curva padrão de AIA no espectrofotômetro com absorvância de 535 nm.

Conclusão

- 1) Todos os isolados de *Trichoderma* e *Gliocladium virens*, com exceção do CEN 512 (*T.atroviride*), são capazes de promover crescimento significativo de raízes e de partes aéreas, em mudas de eucalipto, de acordo com os testes realizados.
- 2) Nenhum isolado de biocontrole produz AIA *in vitro*, pelo método testado.

Referências

- ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 65, n. 7, p. 2926-2933, 1999.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e resumos...** [S.l.]: RBSIB: UFSCcar, 2000. p. 255-258.
- 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**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v. 39, p. 1968-1977, 2007.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews, Microbiologia**, London, UK, v. 2, p. 43-56, 2004.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus***: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Piracicaba: IPEF, 2000. 12 p. (Circular Técnica, 192).

RANASINGH, N; SAURABH, A.; NEDUNCHEZHIAN, M. Use of *Trichoderma* in disease management. **Orissa Review**, p. 68-70, Sept.-Oct. 2006. Disponível em: <<http://orissagov.nic.in/e-magazine/Orissareview/sept-oct2006/engpdf/68-70.pdf>> . Acesso em: 2008.

RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; PINHO, R. G. V.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciências agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

SANTOS, A. F. dos; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil**: identificação e controle. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 20 p. (Embrapa Florestas, Circular técnica, 45).

SANTOS, P. E. T. O uso da clonagem na silvicultura intensiva. **Silvicultura**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 57, p. 28-29, 1994.