

Foto: Celso Garcia Auer



## Isolamento e cultivo de *Trichoderma* para testes de antagonismo a *Armillaria*

Francine Bontorin Silva<sup>1</sup>

Celso Garcia Auer<sup>2</sup>

Nei Sebastião Braga Gomes<sup>3</sup>

Uma das doenças que mais chama a atenção em espécies arbóreas e florestais pela dificuldade de controle químico é a armilariose, causada por fungos de solo do gênero *Armillaria* (KRUGNER; AUER, 2005). O controle biológico é uma das medidas preconizadas contra esses fitopatógenos. Para tal, fungos antagonistas e competidores são empregados, tendo como exemplos principais aquelas espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* (PAPAVIZAS, 1985; HOMECHIN, 1991).

Espécies de *Trichoderma* são reconhecidamente hiperparasitas de vários patógenos, destacando-se *Armillaria* spp. (HAGLE; SHAW, 1991; RAZIQ, 2000). Estudos clássicos mostram a associação parasítica de *Trichoderma* à *Armillaria*, a qual pode ser explorada como forma de controle (BLISS, 1951; PAPAVIZAS, 1985).

O presente trabalho apresenta uma série de informações que podem auxiliar no isolamento e cultivo de *Trichoderma* para seleção de cepas

especializadas em parasitar fungos do gênero *Armillaria*, para programas de controle biológico da armilariose.

### Isolamento

Uma das formas para se direcionar o isolamento de cepas de *Trichoderma* parasitas de *Armillaria* é que esta atividade seja feita com material doente, infectado com o patógeno. O material coletado para isolamento deve ser limpo antes de entrar no laboratório, escovando-se ou raspando-se a casca da planta, para a retirada de solo e de resíduos do campo (FERNANDEZ, 1993). Após limpar a superfície, retira-se a camada externa da casca, usando-se uma faca ou lâmina previamente flambada. Devem-se retirar fragmentos de placa micelial de *Armillaria* visivelmente contaminados pelo fungo *Trichoderma*, facilmente identificáveis pela coloração verde-clara, causada pela esporulação do fungo.

Na capela de fluxo laminar, os fragmentos da placa micelial são retirados e inseridos em placas de Petri

<sup>1</sup>Bióloga, Mestre, Doutoranda do Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, franbontorin@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Engenheiro Florestal, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, auer@cnpf.embrapa.br

<sup>3</sup>Engenheiro Florestal, Doutor, Professor da Universidade Federal do Acre, bragagomes@gmail.com

contendo meio seletivo para *Armillaria* – MSA (extrato comercial de batata-dextrose-agar, 39 g; solução de rosa bengala – 3,3 mg; carbendazim – 20 mg; etanol 96 °GL – 25 mL; cloranfenicol – 250 mg; solução de ácido láctico a 25%, 1 mL; água ultrapurificada, 1000 mL) descrito por Gomes (2005). Todos os ingredientes são misturados antes da esterilização em autoclave, a 120 °C, 15 min. As placas de MSA com os fragmentos são incubadas em câmaras BOD à temperatura de 25 °C, possibilitando o desenvolvimento do antagonista para fora do fragmento e seu crescimento como uma colônia no meio de cultura. Essa metodologia tem sido empregada para a obtenção de isolados de *Armillaria* (AUER et al., 2011), contudo pode ser empregada também para *Trichoderma*, por reduzir a contaminação das culturas com bactérias e outros fungos indesejáveis.

### Purificação de culturas

As culturas de *Trichoderma* são posteriormente transferidas para placas de Petri com meio BDA comercial (extrato de infuso de batata, dextrose e ágar, 39 g; 1000 mL de água destilada) e incubadas em BOD à temperatura de 25 °C. Pequenas porções do meio contendo o micélio da borda das colônias são transferidas para tubos de ensaio ou para novas placas com meio BDA, a fim de se obter as colônias puras.

### Cultivo do fungo *Trichoderma*

Para os estudos de fisiologia e para a produção de micélio para as análises moleculares, os isolados podem ser repicados para novas placas com meio BDA e incubados em câmara BOD à temperatura de 25 °C. Essa temperatura foi considerada por Ferreira et al. (2005) como ótima para o seu crescimento em meio de cultura.

O fungo apresenta crescimento micelial contínuo em meio sólido, de aspecto cotonoso. A coloração inicialmente é branca, tornando-se de coloração verde-clara em função da profusa esporulação. A esporulação é constituída por conidióforos e conídios típicos de *Trichoderma*, de forma esférica a ovóide, de coloração verde-clara.

### Preservação de culturas de *Trichoderma*

Os isolados purificados e identificados podem ser preservados por dois métodos. O primeiro, pelo método da cultura imersa sob refrigeração a 4 °C, com a cultura em tubos de ensaio contendo

meio BDA e seu recobrimento com óleo mineral estéril (FERNANDEZ, 1993; GONÇALVES et al., 2007). Por esse método, as culturas podem ser preservadas por até 10 anos, sem a necessidade de repicagem periódica.

O outro método é o da repicagem periódica em meio BDA (FERNANDEZ, 1993; GONÇALVES et al., 2007), a cada 6 meses, em tubos de ensaio ou placas de Petri com meio BDA.

### Produção de inoculante de *Trichoderma*

Para esta atividade, torna-se necessária uma suspensão de esporos do antagonista. Culturas puras de *Trichoderma* em placas de Petri contendo meio BDA são mantidas sob iluminação artificial contínua (luz fria), à temperatura ambiente próxima de 25 °C, para garantir uma abundante esporulação. Após, preparar uma suspensão de conídios, fazendo-se a raspagem da superfície da cultura com alça de Drigalski e uma alíquota de 10 mL de água estéril e a lavagem da placa com mais 40 mL de água estéril.

Para a formulação do inoculante, pode-se utilizar o método do grão de trigo colonizado pelo fungo *Trichoderma*, relatado por Ferraz et al. (2003). Os grãos de trigo são previamente colocados em água fria e aquecidos até o ponto de fervura. Após, retira-se o excesso de água. Porções de 200 g são acondicionadas em sacos plásticos autoclaváveis e posteriormente esterilizadas em autoclave por uma hora a 120 °C. Para a inoculação, prepara-se uma solução de dextrose (20 g L<sup>-1</sup> de água esterilizada) contendo a suspensão de conídios do fungo com concentração final de 10<sup>6</sup> propágulos mL<sup>-1</sup>. Alíquotas de 3 mL são injetadas em cada saco plástico contendo o substrato, com seringas descartáveis. Posteriormente, o conteúdo é homogeneizado e mantido em prateleiras em condições de temperatura ambiente com luz contínua até a colonização completa do substrato, período que varia entre 7 e 14 dias. Ao final do processo, os sacos se apresentarão com coloração esverdeada, mostrando intensa esporulação do fungo.

Decorrido o período de multiplicação do inóculo, o conteúdo de cada embalagem é transferido para cartuchos de papel, com capacidade para 10 kg para secagem ventilada à temperatura entre 30 e 40 °C, por 48 horas. Após a secagem, o conteúdo é embalado em doses de 200 g e mantido em câmara

fria, a 12 °C, até a aplicação. Recomenda-se a aplicação do inoculante tão logo seja possível, para evitar a perda da sua viabilidade.

O inoculante pode ser usado para implantar os ensaios de controle em plantas envasadas ou de controle de focos da armilariose. Normalmente, nesses ensaios o inoculante é incorporado ao substrato (vaso) ou solo (campo) antes do plantio das mudas de *Pinus* (GOMES, 2005). A dosagem do inoculante pode variar em função da quantidade disponível, do tamanho da área e do potencial de inóculo presente no solo (RAZIQ, 2000). Estudos de controle biológico da armilariose feitos por Gomes (2005) empregaram 200 g de inoculante de *Trichoderma* por cova e mostraram potencial para o controle de *Armillaria* sp. em árvores jovens de *Pinus elliotii* var. *elliottii*.

## Referências

- AUER, C. G.; SILVA, F. B.; GOMES, N. S. B. **Coleta de amostras, isolamento e cultivo de isolados de *Armillaria* sp. de *Pinus***. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 287).
- BLISS, D. E. The destruction of *Armillaria mellea* in citrus soils. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 41, p. 665-683, 1951.
- FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPQ, 1993. 128 p.
- FERRAZ, C. E. P.; DEMBICKI, A. S.; GOMES, N. S. B.; AUER, C. G.; SANHUEZA, R. M. V. Produção de inóculo de *Trichoderma* para o controle da armilariose em *Pinus* spp. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 2., 2003, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2003. p. 2. (Embrapa Florestas. Documentos, 86).
- FERREIRA, M. M.; SILVA, F. B.; AUER, C. G. Estudo preliminar sobre as temperaturas de desenvolvimento de *Trichoderma viride*. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 4., 2005, Colombo. **Anais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2005.
- GOMES, N. S. B. **Armillariose em *Pinus elliotii*: etiologia, determinação de danos e medidas de controle, nos estados do Paraná e de Santa Catarina**. 2005. 96 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase a fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Org.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. v. 1. p. 92-102.
- HAGLE, S. K.; SHAW, C. G. Avoiding and reducing losses from *Armillaria* root rot disease. In: SHAW, C. G.; KILE, G. A. (Ed.). **Armillaria root disease**. Washington, D.C.: Forest Service, USDA, 1991. p. 157-173. (Agriculture handbook, 691).
- HOMECHIN, M. Controle biológico de patógenos do solo. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPQ, 1991. p. 7-23.
- KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças em pinheiros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2. p. 517-522.
- PAPAVIZAS, C. G. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 23-54, 1985.
- RAZIQ, F. Biological and integrated control of *Armillaria* root rot. In: FOX, R. T. V. (Ed.). **Armillaria Root Rot: biology and control of honey fungus**. Andover: Intercept, 2000. p. 183-201.

### Comunicado Técnico, 297

Embrapa Florestas  
Endereço: Estrada da Ribeira Km 111, CP 319  
Colombo, PR, CEP 83411-000  
Fone / Fax: (0\*\*) 41 3675-5600  
E-mail: sac@cnpf.embrapa.br



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



1ª edição  
Versão eletrônica (2012)

### Comitê de Publicações

Presidente: *Patrícia Póvoa de Mattos*  
Secretária-Executiva: *Elisabete Marques Oaida*  
Membros: *Álvaro Figueredo dos Santos, Antonio Aparecido Carpanezi, Claudia Maria Branco de Freitas Maia, Dalva Luiz de Queiroz, Guilherme Schnell e Schuhlí, Luís Cláudio Maranhão Froufe, Marilice Cordeiro Garrastazu, Sérgio Gaiad*

### Expediente

Supervisão editorial: *Patrícia Póvoa de Mattos*  
Revisão de texto: *Rafaele Crisóstomo Pereira*  
Normalização bibliográfica: *Francisca Rasche*  
Editoração eletrônica: *Rafaele Crisóstomo Pereira*