

Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o Controle Biológico de *Rhizoctonia solani* na Propagação Clonal de *Eucalyptus*

Reginaldo G. Mafia¹, Acelino C. Alfenas¹, Luiz A. Maffia¹, Gizella M. Ventura¹ & Eugênio A. Sanfuentes²

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil, e-mail: aalfenas@mail.ufv.br; ²Departamento de Silvicultura, Universidad de Concepcion, Victoria 631, Casilla 154-C, Concepcion, Chile

(Aceito para publicação em 16/10/2002)

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas

MAFIA, R.G., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., VENTURA, G.M. & SANFUENTES, E.A. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. Fitopatologia Brasileira 28:101-105. 2003.

RESUMO

Testou-se um novo sistema para o encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* em grânulos de alginato de sódio, visando o controle biológico de *Rhizoctonia solani*, agente etiológico da mela de estacas/mini-estacas de *Eucalyptus* spp. para enraizamento. No novo sistema idealizado, foi utilizado um aparato simples capaz de substituir eficientemente o equipamento (Bomba Peristáltica) anteriormente utilizado, sendo possível aumentar a produção de 594 grânulos/min para aproximadamente 6.734 grânulos/min. Com este novo sistema, um isolado de *T. inhamatum* (UFV – 03) foi encapsulado em grânulos contendo as fontes alimentares: farelo de trigo, palha de arroz, farelo de aveia, folhas de eucalipto ou farelo de milho na concentração de 50 g/l. Na segunda etapa, a melhor fonte alimentar foi testada nas concentrações de 0 a 60 g/l. Os grânulos foram veiculados em substrato de enraizamento de

eucalipto na concentração de 2% (p/p) inoculado com micélio triturado de *R. solani* (2 mg/g de substrato) e a atividade saprofítica do patógeno foi quantificada por meio do método de iscas. Posteriormente, os grânulos produzidos com a fonte alimentar e concentração que promoveram maior inibição do desenvolvimento de *R. solani* foram utilizados para determinar o tempo mínimo de pré-incubação e competição para supressão do patógeno, com a mesma metodologia. Observou-se aumento da supressão da atividade saprofítica de *R. solani* ao acréscimo de uma fonte alimentar. Das testadas, farelo de trigo foi a melhor. Além disso, houve interação significativa e positiva ao aumento de sua concentração na formulação.

Palavras-chave adicionais: biocontrole, antagonista, formulação granulada.

ABSTRACT

Encapsulation of *Trichoderma inhamatum* for the biological control of *Rhizoctonia solani* in clonal propagation of *Eucalyptus*

A new system of encapsulating *Trichoderma inhamatum* in sodium alginate was developed for controlling *Rhizoctonia solani* blight of *Eucalyptus* spp. cuttings/mini-cuttings used for rooting. In this system, simpler materials and apparatus efficiently replaced the peristaltic pump, increasing pellet production from 594 pellets/min to approximately 6,734 pellet/min. An isolate of *T. inhamatum* (UFV-3) was encapsulated in pellets containing wheat bran, rice husk, oat bran, eucalyptus leaf or maize meal as food base at a concentration of 50g/l. In the second step, the best food base was

evaluated at the concentrations ranging from 0 to 60 g/l. The pellets were added to *R. solani* infested (2 mg-macerated mycelium/g) eucalyptus rooting substrate at the rate of 2% (w/w) and the saprophytic activity of the pathogen was quantified with a baiting technique. The pellets containing wheat bran, which maximally inhibited *R. solani*, were used to determine the minimum pre-incubation and competition period for pathogen suppression. Increasing food base concentration in the pellets increased suppression of *R. solani*. Additionally, there was a significant positive interaction between food base concentration in the formulation and pathogen suppression.

O Brasil possui atualmente a maior área reflorestada com espécies de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no mundo. As plantações destinam-se principalmente à produção de celulose e carvão (Campinhos Jr., 1999). A propagação clonal de *Eucalyptus* spp. foi iniciada comercialmente em meados da década de 80 (Campinhos & Ikemori, 1983). Esta técnica possibilita a formação de talhões homogêneos formados por genótipos silvicultural e tecnologicamente superiores e resistentes a doenças. No entanto, as condições ambientais requeridas para o enraizamento são extremamente favoráveis à incidência de fungos fitopatogênicos, principalmente *Rhizoctonia solani* Kühn (Ferreira, 1989; Alfenas *et al.*, 1997).

Espécies de *Trichoderma* aplicadas de forma isolada, associadas com *Gliocladium virens* Miller, Giddens & Foster ou com espécies bacterianas têm sido extensivamente estudadas no controle de *R. solani* (Hadar *et al.*, 1979; Elad *et al.*, 1980; Harman *et al.*, 1980; Chet & Baker, 1981; Nelson *et al.*, 1983; Beagle-Ristaino & Papavizas, 1985; Kwok *et al.*, 1987; Lewis & Papavizas, 1987; Knudsen & Bin, 1990; Lewis *et al.*, 1998). A ação antagonista de *Trichoderma* spp. ocorre principalmente em função da produção de metabólitos voláteis e não voláteis, como também pelo hiperparasitismo e pela competição por espaço, nutrientes e oxigênio (Martins-Corder & Melo, 1998).

A inexistência de fungicidas registrados para a eucaliptocultura e a baixa eficiência dos produtos químicos impossibilita o seu uso na propagação clonal de *Eucalyptus* spp. (Silveira, 1996). Neste sentido, estudos de controle biológico utilizando espécies de *Trichoderma* têm sido conduzidos no laboratório de Patologia Florestal - UFV (Alonso, 1997; Sanfuentes, 2000). Nestes e em outros estudos tem-se observado o aumento na atividade dos antagonistas quando estes são aplicados após seu cultivo em substratos que lhes sirvam de base nutricional, o que permite um rápido crescimento e colonização do substrato, bem como, em alguns casos, o estabelecimento do hiperparasitismo. Desta forma, com o objetivo de desenvolver uma formulação à base de um isolado de *T. inhamatum* (UFV-3), reconhecidamente eficiente no controle biológico de *R. solani*, construiu-se um aparato simples para a produção massal dos grânulos de alginato de sódio. Em uma segunda etapa, o efeito da adição de fonte alimentar, concentração, tempo de competição e pré-incubação foram avaliados na supressão da atividade saprofítica de *R. solani*.

O isolado de *T. inhamatum* utilizado (UFV-3), foi anteriormente pré-selecionado quanto à capacidade supressiva a *Rhizoctonia* spp., sob condições controladas (Alonso, 1997), e mantido a 10 °C, em tubos com batata-dextrose-ágar (BDA). Empregou-se o isolado RH-18 multinucleado de *R. solani* (AG-1B) obtido de folhas de eucalipto com sintomas de queima foliar coletadas em jardim clonal (Silveira, 1996).

Para a produção massal do antagonista, discos de cultivo em BDA foram repicados para Erlenmeyers de 1.000 ml de capacidade, contendo 500 ml de meio líquido de batata-dextrose (BD), seguindo-se incubação a 27 °C, sob agitação rotativa, a 120 rpm. A massa de micélio foi coletada e lavada três vezes em água destilada esterilizada, sob vácuo (bomba DIA-PUMP®, FANEM, Brasil). Após remover o excesso de água, por prensagem em papel de filtro, a massa de micélio foi armazenada a 4 °C por 24 h, no máximo, antes de seu uso.

Para produzir a formulação do tipo granulada, seguiu-se metodologia adaptada de Lewis & Papavizas (1985). Para isso, 20 g de alginato de sódio (VETEC, MG Química Comercial, Brasil) foram dissolvidos em 750 ml de água destilada esterilizada, em agitador magnético, a 40 °C. O farelo de trigo utilizado como fonte alimentar na concentração de 50 g/l foi homogeneizado em moinho elétrico, passado em peneira de 0,42 mm e esterilizado a seco, a 90 °C, durante 24 h. Após a esterilização, o farelo foi misturado a 250 ml de suspensão de micélio triturado do antagonista, na proporção de 17 g de micélio triturado/l. Essa suspensão foi adicionada à solução de alginato de sódio (750 ml) e gotejada em solução de Cloreto de Cálcio (SIGMA CHEMICAL Co) a 0,25 M, com o auxílio de uma bomba peristáltica de três saídas (P-3 PHARMACIA, USA), velocidade 10, o que permitiu a formação de grânulos esféricos de diâmetro regular. Os grânulos formados, mantidos por, pelo menos, 10 min nesta solução, foram lavados em água de torneira, para remover o excesso de CaCl_2 , e submetidos à secagem sob ventilação forçada, durante dois dias a 26 °C e quatro dias a 30 °C.

Apesar do sucesso do encapsulamento utilizando a bomba peristáltica, com o objetivo de reduzir o tempo necessário para a produção do produto biológico, foi construído um aparato simples a partir de 18 ponteiras (10 ml) acopladas em uma caixa plástica do tipo gerbox (11 x 11 x 3 cm) suspensa numa haste metálica (Figura 1). Para testar a sua eficiência, os grânulos foram produzidos como anteriormente, substituindo apenas a bomba peristáltica utilizada anteriormente pelo aparato descrito.

É possível obter sucesso no encapsulamento de fungos antagonistas em grânulos de alginato de sódio, com o auxílio de equipamentos como a bomba peristáltica. Porém, a maior dificuldade em tornar viável a sua utilização no controle de fitopatógenos em condições de campo está na produção massal de produtos para controle biológico. Neste sistema, utilizando-se o modelo de bomba peristáltica descrita anteriormente, a produção é de aproximadamente 594 grânulos/min. Porém, com o aparato desenvolvido, foi possível aumentar a produção para 6.734 grânulos/min. Ademais, não foram constatadas diferenças significativas quanto ao diâmetro dos grânulos produzidos em ambos os sistemas. Além disso, observou-se que esta variável variou em função do grau de hidratação dos grânulos, sendo em média igual a 2 mm nos grânulos completamente hidratados.

Na segunda etapa, o antagonista (UFV-3) foi encapsulado e se utilizou como fonte alimentar: farelo de trigo, palha de arroz, farelo de aveia), folhas de eucalipto ou farelo de milho, na concentração de 50 g/l. Posteriormente, a melhor fonte alimentar foi testada nas seguintes concentrações: 10,

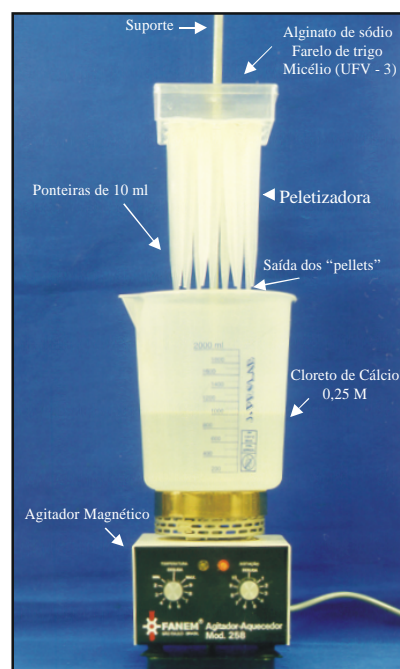


FIG. 1 - Aparato utilizado para a produção massal de "pellets" de alginato de sódio acoplada a uma haste metálica, tendo abaixo solução de CaCl_2 (0,25 M) sob agitação.

20, 30, 40, 50 e 60 g/l.

Antes da montagem dos ensaios, amostras de 60 "pellets" de cada tratamento foram semeadas em meio BDA (pH 5,0) para determinar a viabilidade do antagonista e certificar a inexistência de contaminantes fúngicos e, ou, bacterianos, pela observação das colônias formadas. Em nenhum tratamento foi observada contaminação dos grânulos, bem como, 100% de viabilidade foi obtido mesmo para os grânulos que permaneceram até três meses armazenados a 10 °C.

Os grânulos com as diferentes fontes alimentares foram incorporados em substrato de enraizamento (70% de composto de casca de eucalipto : 30% de vermiculita) esterilizado, na proporção de 2% (p/p) em três amostras de 100 g contidas em caixas plásticas tipo gerbox (11,5 x 11,5 x 3,5 cm), seguindo-se um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Após 72 h de incubação, a 27 °C no escuro, o substrato foi infestado com o isolado RH-18 de *R. solani* (2 mg/g de substrato) seguindo-se a incubação nas mesmas condições anteriores. Em intervalos de cinco dias, estimou-se a densidade de inóculo de *Rhizoctonia* sp. pelo método de iscas (Sanfuentes *et al.*, 1998). Para tanto, 30 segmentos de ramos de eucalipto (15 x 3 mm) por repetição foram inseridos no substrato, incubando-se no escuro a 27 °C. Após 48 h, as iscas foram retiradas, lavadas e desinfestadas com NaClO, a 1000 ppm de Cl₂ ativo, por 3 min, enxaguada duas vezes com água destilada e esterilizada, e semeadas em meio de ágar-água acidificado (pH 5). Após 24-48 h, avaliou-se, sob microscópio, a presença de estruturas do patógeno.

Posteriormente, os grânulos produzidos com a fonte alimentar e concentração que promoveram maior supressividade, foram testados em diferentes tempos de incubação antes e após a infestação com o patógeno, obtendo-se diferentes períodos de competição e pré-incubação do antagonista em relação ao patógeno. Assim, em intervalos de três dias, infestou-se o substrato contido em caixas tipo gerbox do antagonista e do patógeno, obtendo-se diferentes períodos de pré-incubação e competição entre ambos, seguindo-se a mesma metodologia e condições descritas anteriormente.

A aplicação de encapsulados granulados ("pellets") contendo microrganismos antagonistas representa uma excelente inovação para o controle de fungos fitopatogênicos, necessitam, porém, em sua formulação de uma fonte alimentar (Lewis & Papavizas, 1987).

No presente trabalho, os resultados obtidos demonstraram o efeito do antagonista *T. inhamatum* (UFV – 3) na supressão da atividade saprofítica de *R. solani*. No entanto, observou-se grande variação no nível de supressão em resposta as diferentes fontes alimentares utilizadas na formulação.

A importância de se utilizar uma fonte alimentar nas formulações de antagonistas para o controle de fungos fitopatogênicos já foi observada em outros estudos. Dentre as fontes testadas, o farelo de trigo destacou-se e diferiu das demais, reduzindo a densidade de inóculo de *R. solani* para 11,1% e 5,6% a partir do décimo e décimo quinto dias, respectivamente (Tabela 1).

Trichoderma spp. proliferam abundantemente, especialmente quando aplicado como micélio jovem veiculado em farelo de trigo (Lewis & Papavizas, 1985). Com o farelo de trigo apesar de não ter influenciado no crescimento radial de isolados de *Trichoderma* spp., obteve-se maior densidade de hifas (Knudsen & Bin, 1990). Esta fonte alimentar foi considerada como o melhor meio para o crescimento e esporulação de *T. harzianum* (Hadar *et al.*, 1979). Em vista destes resultados, o farelo de trigo foi selecionado como base alimentar na aplicação de *T. inhamatum*.

Com os grânulos contendo farelo de milho ou palha de arroz, apesar de não se ter obtido a maior supressividade, verificou-se redução da densidade de inóculo para 30 e 23,3%, respectivamente, após 15 dias de incubação.

Outros materiais podem ser utilizados para a produção de formulados à base de microrganismos antagonistas. Por exemplo, grânulos de celulose foram utilizados após a ativação com ácido diluído (0,05 N HCl) (Lewis *et al.*, 1998). Estes autores observaram a formação de hifas jovens e com crescimento ativado após dois-três dias, com redução do tombamento de mudas provocado por *R. solani* e o crescimento deste patógeno no solo.

Observou-se incremento significativo na supressão do patógeno, com o aumento da concentração da fonte alimentar (farelo de trigo) (Figura 2). O modelo geral que melhor explicou a relação entre a atividade saprofítica de *R. solani*, expressa pela relação da porcentagem de iscas colonizadas (Y) com a concentração da fonte alimentar (A) e o tempo de incubação (B) foi $Y = 97,88 - 0,34 A - 0,65 B - 0,07 AB$.

Na maior concentração testada, a supressão da atividade saprofítica de *R. solani* foi bastante elevada. Elad *et al.*, (1980) observaram que o controle biológico correlacionou positivamente em relação ao incremento de *T. harzianum*

TABELA 1 - Atividade saprofítica de *Rhizoctonia solani*, expressa pela porcentagem de colonização de iscas de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) por *Rhizoctonia* sp., em função da formulação de *Trichoderma inhamatum* contendo diferentes fontes alimentares

Tratamento	Atividade saprofítica de <i>R. solani</i> (%)			
	0 dia	5 dias	10 dias	15 dias
Testemunha 1 ⁽¹⁾	95,6 a ⁽²⁾	96,7 a	96,7 a	96,7 a
Testemunha 2 ⁽³⁾	91,1 a	84,4 ab	83,3 a	78,9 b
Folha de eucalipto	74,4 bc	96,7 a	98,9 a	96,7 a
Farelo de aveia	87,8 ab	74,4 b	47,8 b	43,3 c
Farelo de milho	87,8 ab	80,0 ab	40,0 b	30,0 d
Palha de arroz	71,1 c	71,1 bc	36,7 b	23,3 d
Farelo de trigo	72,2 bc	54,4 c	11,1 c	5,6 e

(1) Substrato não tratado com grânulos.

(2) Em cada dia, as médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

(3) Substrato tratado com grânulos sem fonte alimentar.

formulado em farelo de trigo aplicado ao solo e negativamente com o nível de infestação pelos patógenos.

Não se observou diferença significativa quanto à redução da sobrevivência e crescimento saprofítico de *R. solani* no solo quando se utilizou pequenas (3,0 - 7,5 g/l) ou grandes (30 g/l) quantidades de biomassa dos antagonistas (*Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp.). Dessa forma, a utilização de doses crescentes de uma fonte alimentar parece ser mais apropriada na formulação dos antagonistas (Lewis & Papavizas, 1987). Segundo estes autores, o tempo em que os "pellets" contendo os antagonistas são adicionados ao solo em relação ao patógeno é muito importante para a efetividade do biocontrole. Da mesma forma, no presente trabalho, observaram-se diferenças na supressividade da atividade saprofítica de *R. solani*, em resposta aos diferentes períodos de aplicação do antagonista em relação ao patógeno e quanto ao tempo de competição entre ambos.

Observou-se relação significativa e negativa entre a atividade saprofítica do patógeno e o tempo de competição. Assim, o mais importante para o controle biológico de *R. solani*, em substrato de enraizamento à base de casca de eucalipto, é o tempo em que o antagonista compete com o patógeno, independentemente do período de pré-incubação de ambos (Figura 3).

Outros fatores devem ser considerados no estabelecimento da supressividade de compostos à base de casca de árvores. A idade do composto, ou seja, o tempo de compostagem é um dos fatores a serem considerados no resultado de compostos supressivos e condusivos (Nelson et al., 1983). Um solo supressivo a *R. solani* continha uma maior população de *T. hamatum* e esta maior taxa de antagonistas foi influenciada pelo pH do solo, pois pH mais ácido estimula a proliferação de *Trichoderma* spp. (Chet & Baker 1981).

Segundo os resultados deste e de outros estudos, a aplicação de microrganismos veiculados em formulações do

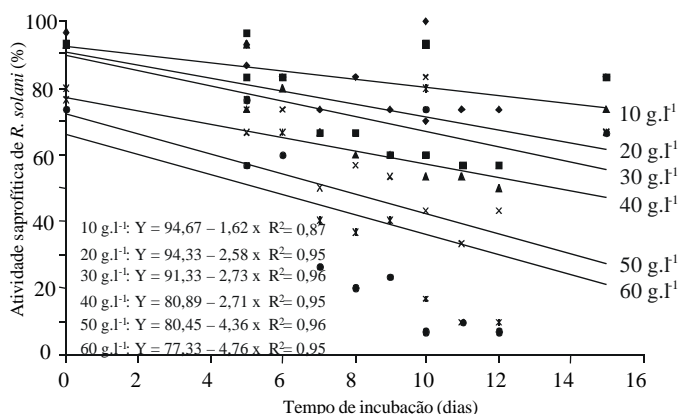


FIG. 2 - Relação entre a atividade saprofítica de *Rhizoctonia solani* (RH - 18), expressa pela porcentagem de iscas colonizadas (Y) em substrato de enraizamento, e o tempo de incubação (X) para as diferentes concentrações de farelo de trigo testadas.

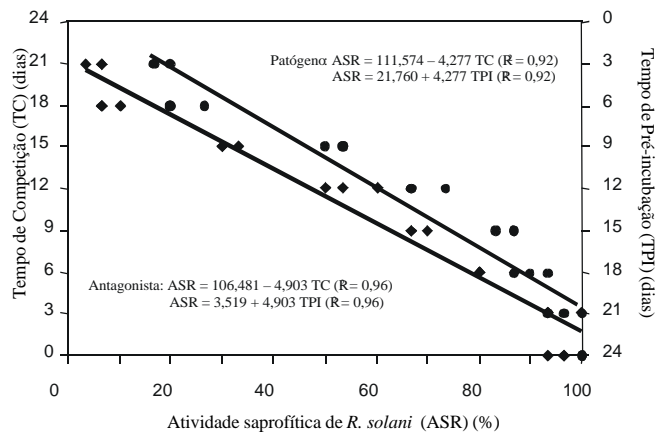


FIG. 3 - Relação entre o tempo de competição (TC), pré-incubação (TPI) e atividade saprofítica de *Rhizoctonia solani* (ASR), expressa pela porcentagem de iscas colonizadas (%) em substrato de enraizamento, submetido à pré-incubação do antagonista (UFV - 3) e do patógeno (RH - 18).

tipo encapsulado granulado é alternativa viável para o controle de fitopatógenos. Especificamente no patossistema estudado, a veiculação de isolados de *Trichoderma* spp. em grânulos de alginato de sódio, contendo farelo de trigo como fonte alimentar na concentração de 50 a 60 g/l, aplicados para permitir pelo menos 18 dias de competição, é uma excelente forma de controle biológico de *R. solani*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., SILVEIRA, S.F. & SANFUENTES, E.A. Current status and control strategies of disease associated to clonal propagation of *Eucalyptus* in: Brazil. IN: IUFRO Conference on silviculture and improvement of *Eucalyptus*. Proceedings. Colombo: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas Florestais, volume 4. 1997.
- ALONSO de, S.K. *Trichoderma longibranchiatum* e *T. inhamatum* como agentes de controle da mela de estacas de eucalipto, causada por *Rhizoctonia*. (Tese de Doutorado). Viçosa, MG, UFV, Imprensa Universitária, 1997.
- BEAGLE-RISTAINO, J.E. & PAPAIVIZAS, G.C. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. *Phytopathology* 75:729-732. 1985.
- CAMPINHOS, E.J. & IKEMORI, Y.K. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. *IPEF* 23:47-52. 1983.
- CAMPINHOS JR., E. Sustainable plantations of high-yield *Eucalyptus* trees for production of fiber: the Aracruz case. *New Forests* 17:129-143. 1999.
- CHET, I. & BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71:286-290. 1981.
- ELAD, Y., CHET, I. & KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:119-121. 1980.

- FERREIRA, F.A. Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 1989.
- HADAR, Y., CHET, I. & HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with brean culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69:64-68. 1979.
- HARMAN, G.C., CHET, I. & BAKER, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedlings diseases induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70:1167-1172. 1980.
- LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, G.C. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. Plant Pathology 34:571-577. 1985.
- LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, G.C. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. Plant Pathology 36:438-446. 1987.
- LEWIS, J.A., LARKIN, R.P. & ROGERS, D.L. A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soilless mix. Plant Disease 82:501-506. 1998.
- KNUDSEN, G.R. & BIN, L. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. Phytopathology 80:724-727. 1990.
- KWOK, O.C.H., FAHY, P.C., HOITINK, H.A J. & KUTER, G.A. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* spp. damping-off in bark compost media. Phytopathology 77:1206-1212. 1987.
- MARTINS-CORDER, M.P. & MELO, I.S. Antagonismo "in vitro" de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. Scientia Agrícola 55: 1-7. 1998.
- NELSON, E.B., KUTER, G.A. & HOITINK, H.A J. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* spp. damping-off in container media amended with compost hardwood bark. Phytopathology 73:1457-1462. 1983.
- SILVEIRA, S.F. Etiologia e controle da mela de estacas e da queima de folhas de eucalipto, causada por *Rhizoctonia* spp. (Tese de Doutorado). Viçosa, MG, UFV, Imprensa Universitária, 1996.
- SANFUENTES, E.A., ALFENAS, A.C., REIS, M.J. & MAFFIA, L.A. Método de isca para recuperação e quantificação de *Rhizoctonia* no solo de jardim clonal e substrato de enraizamento de *Eucalyptus*. Fitopatologia Brasileira 23:278. 1998. (Resumo).
- SANFUENTES, E.A. Caracterização de isolados, flutuação populacional e controle biológico de *Rhizoctonia* spp. em jardim clonal de *Eucalyptus*. (Tese de Doutorado). Viçosa, MG, UFV, Imprensa Universitária, 2000.