

SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. A BENOMIL E IPRADIONE¹

SENSIBILITY OF *Trichoderma* spp. ISOLATES TO BENOMYL AND IPRADIONE

Antonio Carlos Ferreira da Silva² Carlos Renato Echeveste da Rosa³ Itamar Soares de Melo⁴

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade dos isolados selvagens de *Trichoderma* spp.; *T. viride* (Tal1); *T. viride* (T2b); *T. harzianum* (Tal8); *T. viride* (Tligjap); *T. harzianum* (TW5) e *T. harzianum* (TMA4) às concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 µg/ml do ingrediente ativo do fungicida benomil e 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 100,0 µg/ml do ingrediente ativo do fungicida iprodione, *in vitro*. A avaliação consistiu de esporulação após sete dias de incubação, mediante o preparo de suspensão de esporos e contagem em câmara de Neubauer, e do cálculo da porcentagem de redução de crescimento das colônias (RC%) em meio BDA suplementado com as doses estabelecidas de cada fungicida. De modo geral, os fungicidas benomil e iprodione, presentes em meio de cultura, exerceram efeito negativo sobre o crescimento micelial e esporulação dos fungos. O isolado TW5 mostrou-se mais resistente com relação à redução de crescimento na dose de 1,0 µg/ml de benomil e na dose de 10,0 µg/ml de iprodione, sendo também um dos isolados que mais esporulou em presença dos fungicidas.

Palavras-chave: *Trichoderma* spp., controle biológico, resistência, fungicidas.

SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the sensibility of wild isolates of *Trichoderma* spp.; *T. viride* (Tal1); *T. viride* (T2b); *T. harzianum* (Tal8); *T. viride* (Tligjap); *T. harzianum* (TW5) e *T. harzianum* (TMA4); at concentrations of 0; 0.25; 0.5; 1.0; and 2.5 µg/ml of active ingredient of benomyl and at concentrations of 0; 2.5; 5.0; 10.0 e 100.0 µg/ml of iprodione, *in vitro*. Fungitoxicity was evaluated by measuring sporulation, in Neubauer chamber, after seven days of incubation and calculation of colony growth rate. In general, benomyl and iprodione impaired micelial growth and sporulation. The isolate TW5 showed to be less affected by the fungicides. The mycelial growth was reduced at benomyl and at iprodione, and it also

produced more spores in the presence of fungicides than the others isolates.

Key words: *Trichoderma* spp., biological control, resistance, fungicides.

INTRODUÇÃO

A maioria dos relatos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos apresenta o *Trichoderma* spp. como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (ELAD *et al.*, 1983; HADAR *et al.*, 1979; CASSIOLATO *et al.*, 1996). No entanto, poucos trabalhos têm sido realizados a propósito de resistência induzida a fungicidas, em agentes de biocontrole, para seu uso no controle integrado de doenças (HOMECHIN, 1987; CASSIOLATO *et al.*, 1996; SILVA, 1997).

A indução de resistência a fungicidas em *Trichoderma* spp. e a conseqüente seleção de biótipos estáveis para serem utilizados em combinação com fungicidas são uma opção para se obter um esquema de controle efetivo que envolve pesquisas biológicas e químicas no controle integrado de um ou mais fitopatógenos. Conídios e micélio de isolados resistentes podem ser usados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo (PAPAVIZAS, 1985).

Trichoderma spp. tem comportamento variável em relação a fungicidas, são tolerantes a

¹Trabalho desenvolvido na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) e na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

²Engenheiro Agrônomo, MSc., Doutor em Ciências, Professor do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS. E-mail: accsilva@sma.zaz.com.br, Autor para correspondência.

³Estudante de Agronomia, Bolsista de Iniciação Científica do CNPq, Centro de Ciências Rurais, UFSM.

⁴Engenheiro Agrônomo, Doutor, Setor de Fitopatologia, CNPMA/EMBRAPA/Jaguariúna-SP.

captan, iprodione, etheridiazole, PCNB e thiram, mas não são tolerantes aos benzimidazóis (ABD-EL MOITY *et al.*, 1982; ALLEN *et al.*, 1980; CHANG *et al.*, 1986; PAPAVIDAS, 1980; STRASHNOW *et al.*, 1985; CASSIOLATO *et al.*, 1996). WENSLEY & HUANG (1970) recuperaram *Trichoderma* e *Penicillium* sp. de solos tratados com 40 a 160µg de benomil por grama de solo, e observaram em laboratório que *T. viride* se desenvolveu em solo contendo 5µg de benomil por grama de solo, apesar de ter sido inibido em meio ágar contendo 1µg do fungicida.

Entre os mecanismos de resistência a fungicidas, pode-se citar: modificação no sítio de ação, resultando em menor afinidade com o fungicida; desvio do sítio bloqueado por uma operação alternativa, redução da absorção ou acúmulo do fungicida, processos de desintoxicação, etc. (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982; GHINI, 1989).

A resistência aos benzimidazóis em fungos filamentosos pode ser adquirida pela alteração estrutural da β-tubulina, componente do heterodímero tubulina dos microtúbulos, tendo em vista que os benzimidazóis agem diretamente sobre os microtúbulos (DAVIDSE & FLACH, 1977; GOLDMAN *et al.*, 1993).

A importância da indução de biótipos de *Trichoderma* spp. resistentes a biocidas está em sua utilização em combinação com fungicidas em um esquema de controle efetivo de um ou mais fitopatógenos, sendo, portanto, necessárias pesquisas biológicas e químicas. Segundo ABD-EL MOITY *et al.* (1982), a combinação de iprodione com um isolado de *T. harzianum*, estirpe T, resistente a iprodione, resultou em um alto índice de controle de *S. cepivorum*, em cebola, quando comparado ao emprego somente do fungicida. Em condições de campo, isolados de *Trichoderma* spp., resistentes a diferentes fungicidas, controlaram parcialmente *B. cinerea* em uva quando utilizado sozinho. Melhores resultados foram obtidos com a combinação de fungicidas (uma pulverização com benomil ou vinclozolin) e controle biológico (GULLINO & GARIBALDI, 1988). A utilização do controle integrado é um controle mais seguro, havendo menor perigo de desenvolvimento de resistência no patógeno (TRONSMO, 1989). O presente trabalho visou a avaliar a sensibilidade de isolados selvagens de *Trichoderma* spp. através do crescimento micelial e esporulação na presença dos fungicidas benomil e iprodione *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios do Departamento de Biologia da Uni-

versidade Federal de Santa Maria, RS e Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, SP.

Foram utilizados seis isolados de *Trichoderma* spp., antagonistas de fitopatógenos, pertencentes a micoteca do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental /EMBRAPA, Jaguariúna, SP: *T. viride* (Tal1); *T. viride* (T2b) e *T. harzianum* (Tal8) procedentes de culturas de alfaca de Moji das Cruzes/SP; *T. viride* (Tligiap) procedente do Japão; *T. harzianum* (TMA4) procedente de culturas de eucalipto de Piracicaba/SP e *T. harzianum* (TW5) cedido pelo Centro Nacional de Pesquisa da Soja-EMBRAPA, Londrina, PR.

As soluções-estoque dos fungicidas Benomil [1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato de metila] na formulação de Benlate 500 (50% de ingrediente ativo), Du Pont do Brasil S.A.; e Iprodione [3-(3,5-diclorofenil)-N-(1-metil-etil)-2,4-dioxo-10-timidazolina carboximida] na formulação de Rovral (50% de ingrediente ativo), Rhodia S.A., foram preparadas pela técnica de EDINGTON *et al.* (1971), modificada por MENTEN *et al.* (1976), dissolvendo-se o produto em 5,0ml de acetona e completando-se o volume para 100ml de água destilada esterilizada (solução-estoque). A partir desta solução, foram feitas diluições em série, transferindo-se uma alíquota de 1,0ml de cada suspensão para 100ml de meio de cultura fundente, de maneira a serem obtidas as concentrações desejadas.

O comportamento dos seis isolados de *Trichoderma* spp. (Tal1, T2b, Tligiap, Tal8, TMA4 e TW5) foram estudados nas concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5µg/ml do ingrediente ativo do fungicida benomil e 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 100,0µg/ml do ingrediente ativo do fungicida iprodione. As colônias dos seis isolados selvagens foram inicialmente cultivadas em meio BDA, composto de 200g de batata, 20g de dextrose, 15g de ágar, água destilada, suficiente para completar 1000ml; pH 5,6 ajustado com HCl 1N e, após 5 dias de incubação, discos de meio, contendo micélio e conídios com 0,7 cm de diâmetro, foram retirados da margem das colônias e transferidos para placas de Petri contendo BDA suplementado com fungicida. A incubação deu-se a temperatura ambiente sob luz fluorescente contínua. Foram usadas três placas de Petri para cada isolado e cada concentração, constituindo-se em dois experimentos fatoriais no delineamento em blocos ao acaso com três repetições. No experimento um, os seis isolados e as concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5µg/ml do ingrediente ativo do fungicida benomil, e no experimento dois os seis isolados e as concentrações de 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 100,0µg/ml do ingrediente ativo do fungicida iprodione.

A avaliação consistiu da contagem da esporulação, após sete dias de incubação e a partir do preparo de suspensão de esporos e contagem em câmara de Neubauer. As suspensões de esporos foram preparadas em tubos de ensaio com 10ml de solução de "tween 80" (0,1% de "tween 80" em água destilada, com posterior autoclavagem e armazenamento em refrigerador a 4°C), colocando dois discos de meio com 0,7cm de diâmetro, contendo conídios e micélio das margens das colônias. Em seguida, os tubos foram mantidos sob agitação por 10 minutos. O cálculo da porcentagem de redução de crescimento das colônias (RC%) foi realizado utilizando-se a fórmula: $RC\% = (DP - CTF)DP \times 100$, onde DP é o diâmetro da placa de Petri (9,0cm) e CTF é o total de crescimento da colônia (em cm) nos tratamentos. A medida do diâmetro das colônias em crescimento foi efetuada no momento em que as testemunhas (tratamentos na dose 0µg/ml de fungicidas) tiveram crescimento máximo na placa de Petri.

Foi efetuada uma análise de variância visando a verificar a existência de interação entre isolado e concentração de fungicidas, comparação de médias de isolados pelo teste de Duncan (5%) e ajuste do modelo de regressão logarítmico para as concentrações de fungicida, dentro de cada isolado ou no geral, conforme significância ou não da interação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito exercido pelas concentrações dos fungicidas benomil e iprodione sobre o crescimento micelial e a esporulação dos isolados foi variável de acordo com os isolados e os fungicidas testados. Foram observadas interações significativas entre as concentrações testadas e os isolados, indicando que houve dependência entre os dois fatores (figuras 1, 2, 3 e 4). De modo geral, os fungicidas benomil e iprodione, presentes em meio de cultura, exerceram efeito negativo sobre o crescimento micelial dos isolados de *T. harzianum* e *T. viride*. Para benomil (figura 1), a partir de 2,5µg/ml, ocorreram reduções semelhantes no crescimento dos isolados, com exceção do isolado TW5, em que a redução do crescimento micelial foi próxima a 25%, sendo o mais resistente. A 1,0µg/ml, os isolados TMA4, Tligjap, Tal8, T2b e Tal1 apresentaram acima de 60% de redução, sendo que o isolado TW5 foi o mais resistente, abaixo de 40% de redução de crescimento. Para iprodione (figura 2), foram observadas reduções próximas a 100% no crescimento de todos os isolados a partir de 100µg/ml. A 10µg/ml, os isolados T2b e Tligjap apresentaram reduções próximas a

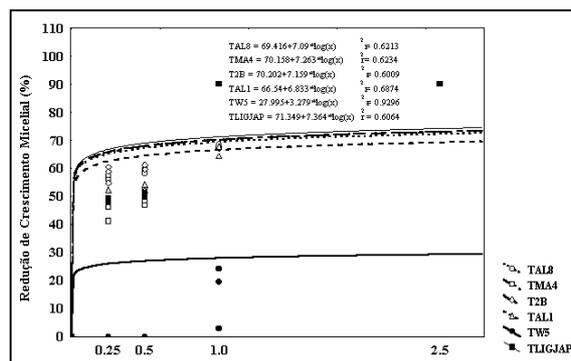


Figura 1 - Curvas logarítmicas da redução do crescimento micelial (%) dos isolados Tal8, TMA4, T2B, Tal1, TW5 e Tligjap de *Trichoderma* spp., em função de doses de benomil.

70% de crescimento e os isolados Tal8, TMA4 e Tal1 abaixo de 70% de redução, sendo o isolado mais resistente o TW5 com cerca de 50% de redução do crescimento micelial. Na concentração de 5,0µg/ml e 2,5µg/ml, os isolados menos afetados foram TMA4 e TW5, sendo que o isolado mais resistente a 2,5µg/ml e a 5,0µg/ml foi TW5.

Como para o crescimento micelial, os fungicidas benomil e iprodione, presentes em meio de cultura, também exerceram efeito negativo sobre a esporulação dos isolados de *T. harzianum* e *T. viride*. O efeito exercido pelos fungicidas foi variável de acordo com os isolados e as concentrações testadas. Para benomil (figura 3), a partir de 1µg/ml não foi observada esporulação nos isolados, com exceção dos isolados Tal1 e TW5. A 0,5 e 0,25µg/ml, os isolados TMA4, Tal1 e TW5 foram os que mais esporularam em relação aos demais. Para iprodione (figura 4), a partir de 10,0µg/ml não houve

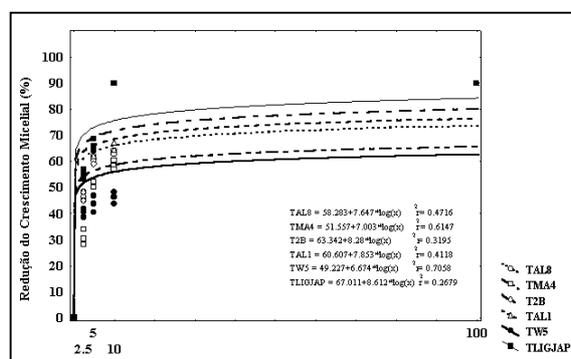


Figura 2 - Curvas logarítmicas da redução do crescimento micelial (%) dos isolados Tal8, TMA4, T2B, Tal1, TW5 e Tligjap de *Trichoderma* spp., em função de doses de iprodione.

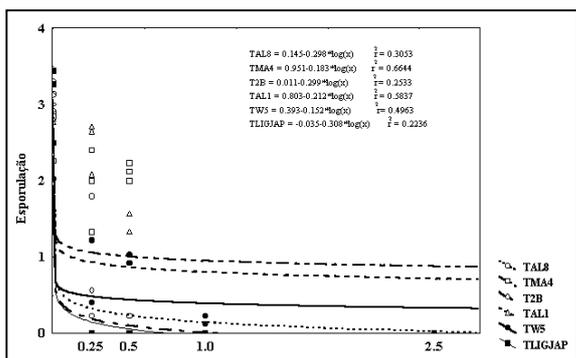


Figura 3 - Curvas logarítmicas da esporulação (esporos $\times 10^5$ /ml) dos isolados Tal8, TMA4, T2B, Tal1, TW5 e Tligjap de *Trichoderma* spp., em função de doses de benomil.

esporulação dos isolados. A 0,5 μ g/ml, apenas os isolados TMA4 e TW5 esporularam, sendo que o isolado TMA4 foi o que mais esporulou. A 2,5 μ g/ml, os mais resistentes foram o TMA4 e Tligjap, sendo ainda o TMA4 o melhor isolado.

O interesse em estudar a resistência de isolados de *Trichoderma* spp. a fungicidas está na utilização deste antagonista no controle integrado de fitopatógenos. Conídios e micélio de isolados resistentes podem ser usados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo (PAPAVIZAS, 1985). O comportamento de *Trichoderma* spp. é variável em relação aos fungicidas de maneira geral, podendo ser resistentes a iprodione, mas não aos benzimidazóis (ABD-EL MOITY *et al.*, 1982; ALLEN *et al.*, 1980; CHANG *et al.*, 1986; PAPAVIZAS, 1982; STRASHNOW *et al.*, 1985). Esta afirmação concorda com os resultados obtidos que mostram ser os isolados de *T. viride* e *T. harzianum* mais resistentes a iprodione em relação ao benomil (figuras 1, 2, 3 e 4). HOMECHIN (1987) testou sete isolados de

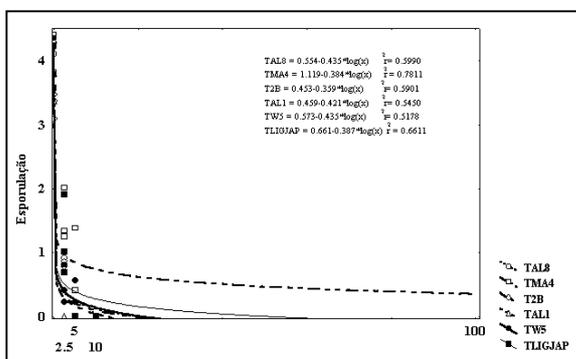


Figura 4 - Curvas logarítmicas da esporulação (esporos $\times 10^5$ /ml) dos isolados Tal8, TMA4, T2B, Tal1, TW5 e Tligjap de *Trichoderma* spp., em função de doses de iprodione.

T. harzianum quanto à resistência aos fungicidas benomil, thiram + iprodione, thiram, thiabendazole e captan. Concentrações acima de 0,1 μ g/ml de todos os fungicidas testados inibiram o crescimento micelial, enquanto que thiram e thiram + iprodione inibiram a esporulação. SANTOS (1989) testou isolados de *Trichoderma* spp. quanto a sua resistência ao benomil, iprodione, captan e procimidone. Os isolados testados foram sensíveis a benomil para todas as concentrações testadas. Para iprodione, a partir de 1,0 μ g/ml, foi observada inibição acima de 55%. Os resultados demonstram (figuras 1, 2, 3 e 4) reduções no crescimento micelial e na esporulação a partir de 0,25 μ g/ml de benomil e 2,5 μ g/ml de iprodione para os isolados de *T. harzianum* e *T. viride*.

CONCLUSÃO

Os fungicidas benomil e iprodione presentes em meio de cultura exercem efeito negativo sobre o crescimento micelial dos isolados de *T. harzianum* e *T. viride*. O isolado TW5 de *T. harzianum* é o mais resistente na presença dos fungicidas benomil e iprodione, em relação à esporulação e ao crescimento *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à FAPERGS pelo auxílio concedido e, também, à Prof. Dra Ana Maria Rodriguez Cassiolato/UNESP/Ilha Solteira e ao Prof. MSc Rocco Di Mare/Departamento de Biologia/UFSM, pelo auxílio na condução e análise dos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL MOITY, T.H., PAPAVIZAS, G.L., SHATLA, M.N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. *Phytopathology*, Lancaster, v. 72, p. 394-400, 1982.
- ALLEN, R.N., PEGG, K.G., GORSBERG, L.I. *et al.* Fungicidal control in pineapple and avocado of diseases caused by *Phytophthora cinamomi*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, v. 20, p. 119-124, 1980.
- CASSIOLATO, A.M.R., BAKER, R., MELO, I.S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes de *Trichoderma harzianum* em segmentos de aipo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, p. 120-122, 1996.
- CHANG, Y.C., BAKER, R., KLEIFELD, R., *et al.* Increased growth of plants in presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, Beltsville, v. 70, p. 145-148, 1986.
- DAVIDSE, L.C., FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimicrobial agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 72, p. 174-193, 1977.

- DEKKER, J., GEORGOPOULOS, S.G. **Fungicide resistance in crop protection**. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. 265 p.
- EDINGTON, L.V., KHEW, K.L., BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of Benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- ELAD, Y., BARAK, R., CHET, I., *et al.* Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma* spp. and plant pathogenic fungi. **Phytopatologische Zeitschrift**, Berlin, v. 107, p. 168-175, 1983.
- GHINI, R. **Resistência de fungos a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas; uma revisão**. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, 1989. 21 p. CNPDA Documentos, 9.
- GULLINO, M.L., GARIBALDI, A. Biological and integrated control of grey mould of grape in Italy. **Trichoderma Newsletter**, Coventry, n. 4, p. 4, 1988.
- GOLDMAN, G.H., TEMMERMAN, W., JACOBS, D. ; *et al.* A nucleotide substitution in one of the β -tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimetabolic drug methyl benzimidazole-2-yl-cabamate. **Molecular Genetics**, v. 240, p. 73-80, 1993.
- HADAR, Y., CHET, I., HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat-ban culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 69, p. 64-68, 1979.
- HOMECHIN, M. **Potencial em emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum* Rifai para controle de patógenos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Piracicaba -SP, 1987. 186 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1987.
- MENTEN, J.O.M., MACHADO, C.C., MINUSSI, E., *et al.* Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. *in vitro*. Apresentado ao 9. Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Campinas, 1976. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, jun. 1976.
- PAPAVIZAS, G.C. Induced tolerance of *Trichoderma harzianum* to fungicides. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, p. 691-692, 1980.
- PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea bean rhizospheres. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, p. 1212, 1982.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 23-54, 1985.
- SANTOS, T.M.C., MELO, I.S. **Resistência de Isolados de *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. a fungicidas *in vitro***. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, 1989, 18 p. Boletim técnico, 5.
- SILVA, A.C.F. Uso de radiação gama para obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai e *Trichoderma viride* Pers.: Fr. com capacidade melhorada no controle ao *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Piracicaba, 1997. 143 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo, 1997.
- STRASHNOW, Y., ELAD, Y., SIVAN, A., *et al.* Integrated control of *Rhizoctonia* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. **Plant Pathology**, London, v. 34, p. 146-151, 1985.
- TRONSMO, A. *Trichoderma harzianum* used in integrated control of *Botrytis cinerea* rot on apple. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, p. 1153, 1989.
- WENSLEY, R.N., HUANG, C.M. Control of *Fusarium* wilt of musk melon and other effects of benomil soil drenches. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, p. 615-620, 1970.