

Estudos da atividade de fungicidas para o controle do crescimento de *Trichoderma* sp em meio de cultura de micropropagação de plantas

Costa, J. S.¹, Atroch, E.M.A.C.¹, Nagao, E.O.¹

¹Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Av. Gal. Rodrigo Otávio 3000 Coroado Manaus AM.
E-mail: jsc.ufam@gmail.com, eatroch@hotmail.com, eonagao@ufam.edu.br

Resumo

Com o objetivo de avaliar a eficiência de alguns fungicidas na inibição de *Trichoderma* sp. testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do ICB/UFAM. Os fungicidas utilizados foram: Amistar, Cuprogarb, Manzate, Priori. Os tratamentos foram compostos pela adição ao meio de MS dois fungicidas na concentração de 0,1gL⁻¹. A adição dos fungicidas foi realizada em duas condições, antes e depois da autoclavagem do meio. A eficiência dos fungicidas foi verificada através da aferição perpendicular dos diâmetros das colônias em milímetros, obtendo-se a média geral por tratamento, e pela determinação da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando-se a fórmula: $PIC = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento} \times 100) / \text{diâmetro da testemunha}$. A maior inibição do crescimento dos inóculos de *Trichoderma* sp. ocorreu nos tratamentos com o fungicida sistêmico Amistar® autoclavado e não autoclavado onde o percentual de inibição foi de 8,69a e 6,25a. Os fungicidas Cuprogarb, Manzate, Priori apresentaram baixa eficiência no controle do patógeno, evidenciando que o isolado em estudo é tolerante a estes produtos.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, controle de doenças, resistência a fungicidas.

Introdução

Indispensáveis na relação planta-hospedeiro, muitos microrganismos representam a possibilidade das plantas ampliarem mecanismos de defesa e utilização dos recursos do ambiente, a exemplo da importância de micorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Entretanto, na cultura *in vitro* de plantas, os microrganismos geram o primeiro gargalo no

estabelecimento de microcultivos, sendo que a contaminação poderá ocorrer em diferentes fases dos procedimentos necessários à introdução de plantas *in vitro*, desde as condições de manutenção das plantas matrizes, que serão fontes de explantes, até a manipulação para introduzi-los no meio de cultura. Assim, existem várias fontes de contaminação em todo o processo que inclui o material vegetal, os instrumentos de trabalho, o ambiente laboratorial e o trabalho dos técnicos (García, 2003). Além disso, muitos microrganismos se desenvolvem endofiticamente sem representarem risco para as plantas na natureza, mas podem vir a desenvolver-se na condição de microcultivo constituindo-se em contaminantes.

Desta forma, é fundamental associar boas práticas de manipulação ao emprego de substâncias antimicrobianas que possam garantir o sucesso da assepsia. Para tal utilizam-se agentes bactericidas e fungicidas, de amplo espectro, para o controle da contaminação. Este cenário põe em destaque a eficiência de fungicidas e/ou bactericidas empregados, e suas formas de uso nos protocolos de assepsia.

Muitos fatores influenciam o sucesso da descontaminação, como a origem do material, se cultivado em condições fitossanitárias adequadas e suas características morfológicas, como por exemplo, a presença de pelos na epiderme que dificultem os processos de limpeza e descontaminação (Hussain, 2012). Nota-se também, em boa parte dos casos, que os fungos, tais como *Penicillium* spp. *Trichoderma* spp. *Lasiodiplodia* spp. *Xylaria* spp são contaminantes importantes. Assim, os protocolos de assepsia buscam combinar técnicas e substâncias que possam funcionar tanto na planta matriz, em condição de viveiro, como nos procedimentos em laboratório para limpeza dos microrganismos epifíticos e controle dos endofíticos do explante. Quando tais métodos mostram-se ineficientes, existe a alternativa de adicionar as substâncias descontaminantes ao meio de cultura. Contudo, a adição segura desses compostos depende da estabilidade perante autoclavagem e da eficiência no controle do crescimento dos organismos em questão. Ademais tal procedimento só deverá ser aplicado quando esgotadas as possibilidades de promover a assepsia antes da inoculação do explante, uma vez que fungicidas e bactericidas podem influenciar no desenvolvimento das plantas *in vitro*, sendo escassos os estudos que tratem da segurança destas substâncias associadas à micropropagação de plantas, conforme verificado por Msogoya et al (2012) em trabalho que objetivou o controle do crescimento de bactérias e fungos no cultivo *in vitro* de banana, pela adição de antibióticos e antifúngicos no meio de cultura.

Assim buscou-se avaliar a eficiência dos fungicidas dos grupos químicos azoxistrobina (sistêmicos), ditiocarbamato e oxicloreto de cobre (ambos fungicidas de contato), adicionados antes e após autoclavagem, ao meio de cultura de MS (1962), sobre o crescimento *in vitro* de *Trichoderma* sp, com vistas a incluir substâncias fungicidas nos meios para micropropagação em ensaios futuros.

Material e Métodos

O efeito de diferentes fungicidas no controle do *Trichoderma* sp foi analisado por meio de testes *in vitro*, realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do ICB/UFAM.

Os inóculos do fungo foram obtidos a partir da contaminação de gemas *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith). Em seguida, repicados para placas de Petri com meio constituído pelos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), empregado na micropropagação de plantas, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de agar, e pH ajustado para 5,8.

Os tratamentos foram compostos pela adição ao meio de MS de dois fungicidas do grupo azoxistrobina (sistêmicos); e ditiocarbamato e oxicloreto de cobre (de contato), em concentração de 0,1g L⁻¹. A adição dos fungicidas foi realizada em duas condições, antes e depois da autoclavagem do meio. Após a homogeneização foram vertidos em placas de Petri de 15 cm. Com o meio solidificado, cada placa recebeu quatro discos de micélio de 07 mm de *Trichoderma* sp. As condições de crescimento foram as da micropropagação, em sala de crescimento com temperatura de 29±2 °C por sete dias, sendo as placas protegidas da luz. Como testemunha foram utilizadas placas de Petri contendo meio de MS sem fungicida.

A eficiência dos fungicidas foi verificada através da aferição perpendicular dos diâmetros das colônias em milímetros, obtendo-se a média geral por tratamento, e pela determinação da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando-se a fórmula: $PIC = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento} \times 100) / \text{diâmetro da testemunha}$.

A mensuração do crescimento micelial radial foi realizada a cada 24 horas, durante seis dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e duas repetições por tratamento com quatro inóculos por placa.

Resultados

Os fungicidas apresentaram efeitos diferenciados sobre o crescimento dos inóculos, conforme detectado pela análise de variância ($p \leq 0,01$). A maior inibição do crescimento ocorreu nos tratamentos com o fungicida sistêmico Amistar®, principalmente quando não autoclavado (Tabela 1). Os tratamentos referentes a adição dos fungicidas de contato dos grupos de ditiocarbamato autoclavado e oxiclreto de cobre, nas duas condições de autoclavagem, não resultaram em nenhum controle do crescimento do fungo.

Tabela 1. Média dos efeitos dos tratamentos sobre o crescimento dos inóculos

Tratamento	Crescimento
Ditiocarbamato não autoclavado	40.0 a
Priori® autoclavado (sistêmico)	29.7 b
<i>Priori® não autoclavado</i>	27.6 bc
Amistar® autoclavado (sistêmico)	24.7 cd
Amistar® não autoclavado	22.1 d

¹Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A porcentagem da inibição do crescimento (PIC) apresentou resultados diferenciados em resposta aos tratamentos, de acordo com a análise de variância ($p \leq 0,01$). Confirmou-se a maior atividade do fungicida Amistar®, autoclavado ou não, na inibição do crescimento dos inóculos de *Trichoderma* sp. Notou-se que em alguns tratamentos, a presença do fungicida estimulou o crescimento do fungo (PIC negativo), em lugar de inibição, e que tal condição favoreceu quando o fungicida não foi autoclavado (Tabela 2).

Tabela 2. Média dos efeitos dos tratamentos sobre a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) em relação à testemunha (n=40)

Tratamento	PIC
Ditiocarbamato não autoclavado	-65,52c
Priori® autoclavado	-14,01b
Priori® não autoclavado	-24,11 ab
Amistar® autoclavado	8,69a
Amistar® não autoclavado	6,25a

¹Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Discussão

A frequência da contaminação por fungos resultou em procedimentos que inclui a aplicação de substâncias fungicidas em alguma fase da micropropagação, constituindo parte da assepsia. Os fungicidas podem ser empregados desde os cuidados com a planta matriz e/ou procedimentos de limpeza antes da inoculação (Barrueto Cid e Zimmerann, 2006), e até no próprio meio de cultura (Londe et al., 2007). De forma semelhante ao verificado neste trabalho com *Trichoderma* sp (Quadro 1), Tavares e Souza (2005) relataram alta eficiência de fungicida do grupo da Azoxistrobina, quando adicionados ao meio BDA, para o controle do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Também a adição do fungicida Benomyl ao meio de MS, resultou em maior controle da contaminação por fungos na micropropagação de *Anacardium humile* (LONDE et al., 2007). Utilizando vários tipos de fungicidas no meio de MS para o estabelecimento *in vitro* de gemas laterais de mangueira, Andrade et al. (2008) verificaram que a presença de fungicida Tebuconazole resultou em maior controle da contaminação, enquanto que o meio com Mancozebe, também do grupo ditiocarbamato, de forma semelhante ao desempenho desta substância aqui observado (Quadros 1 e 2), apresentou os maiores índices de contaminação dos explantes, embora este fungicida tenha demonstrado bom desempenho em experimentos de campo. Tal situação se explica pela condição nutritiva do meio de MS que, rico em nutrientes minerais, e adicionado de uma fonte de carbono, sem dúvida favorece o crescimento de microrganismos, os quais são mais facilmente controlados quando a planta é cultivada no campo ou viveiro.

A inclusão de substância antibiótica ao meio de cultura precisa ser otimizada para garantir a eficiência. Neste sentido, o procedimento de autoclavagem pode causar alterações na eficácia dessas substâncias, como sugere os resultados aqui verificados para os fungicidas Amistar® e Piori® quando não autoclavados (Quadros 1 e 2). Outro aspecto é que a decisão de adicionar substâncias que inibem o crescimento de microrganismos *in vitro*, juntamente com o explante, precisa também considerar a verificação de efeitos prejudiciais ao desenvolvimento das plantas durante o microcultivo e no período de aclimatização.

Conclusões

O fungicida Amistar®, autoclavado, apresenta maior eficiência para o controle de *Trichoderma* sp no meio de cultura de MS.

- A eficiência dos fungicidas foi alterada durante o processo de autoclavagem.

Referências

Andrade SEM, Oliveira WC, Reis Júnior FB, Charchar MJ, Faleiro, FG, Metha A, Texeira JB, Peixoto JR (2008) Controle do crescimento e identificação de microrganismos contaminantes visando à micropropagação de gemas laterais de mangueira. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, n. 217. Embrapa Cerrados.

Barrueto LP, Zimmermann MJA (2006) Contaminação *in vitro* de plantas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 20 p.

García PC, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L (2003) The role of fungicides in the physiology of higher plants: implications for defense responses. *The Botanical Review*, 69:162–172.

Hussain A, Qarshi IA, Nazir H, Ullah I (2012) Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. Chapter 1: Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/40180.pdf> Acesso em: 20/8/2014.

Londe LN, Sousa CS, Vieira CU, Bonetti AM, Kerr WE (2007) Efeito do Benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). *Bioscience Journal*, Uberlândia, 23(3):94-100.

Msoyoya T, Kanyagha H, Mutigitu J, Kulebelwa M, Mamiro D (2012) Identification and management of microbial contaminants of banana *in vitro* cultures. *Journal of Applied Biosciences*, 55:3987– 3994.

Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

Tavares GM, Souza PE (2005) Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 29(1):52-59.