

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE ALFACE POR
Trichoderma harzianum

Ana Maria R. Cassiolato¹
Ralph Baker²
Itamar Soares de Melo³

INTRODUÇÃO

Fitopatógenos do solo podem causar grandes perdas em culturas por todo o mundo (PAPAVIZAS, 1985). Os pesticidas químicos têm proporcionado controle de muitos patógenos e reduzido perdas, favorecendo a produção agrícola. Entretanto, criaram novos problemas, como o aparecimento nos fitopatógenos de resistência aos pesticidas. Além disso, afetam organismos que não estão sendo combatidos, contaminam o meio ambiente, e deixam resíduos que podem ser tóxicos ao homem. Devido aos problemas apresentados e à legislação existente, tornou-se prioridade para muitos pesquisadores o desenvolvimento de medidas alternativas de controle (LUMESDEN & LEWIS, 1989). Muitos agentes de biocontrole de fitopatógenos têm sido testados com sucesso. Apesar dos excelentes resultados obtidos, seu uso rotineiro na agricultura ainda não é extensivamente praticado. Uma característica que poderia torná-los mais atrativos seria o fato de poderem atuar melhorando a produção além de controlar os patógenos. Conhecido por ser um eficiente agente de biocontrole de fitopatógenos, *Trichoderma* spp. também têm antecipado e/ou aumentado a germinação de sementes,

¹ UNESP/Fac. Eng. Dep. de Biologia. Caixa Postal 31, CEP 15385-000 Ilha Solteira-SP. Bolsista do CNPq. Parte da Tese de Doutorado.

² *In memoriam*. Department of Plant Pathology & Weed Science, Colorado State University, Fort Collins, CO, 80523, EUA.

³ CNPMA/EMBRAPA. Caixa Postal 69, CEP 13820-000 Jaguariúna-SP.

o tamanho e o peso de matéria seca das plantas, antecipado a floração e ampliado o número de botões e de podas (AHMED & BAKER, 1987; BAKER, 1987, 1989, 1991; BAKER et alii, 1984, 1986; CHANG et alii, 1986; LINCH et alii, 1991; PAULITZ et alii, 1987; WINDHAM et alii, 1986). *Trichoderma* spp. têm comportamento variável em relação aos fungicidas. Trabalhos têm sido realizados para a indução de resistência a fungicidas visando ao seu uso no controle integrado. Entretanto, pouco tem sido feito a propósito do emprego destes agentes de biocontrole portadores de resistência, como também promotores de crescimento de plantas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar mutantes de *T. harzianum* TW5 e WT-T95, resistentes ao Benomil, como promotores de crescimento em plantas de alface, na ausência ou presença dos fungicidas Benomil e Iprodione.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Controle Biológico de Fitopatógenos e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia e Plantas Daninhas da Colorado State University, Fort Collins, EUA.

Isolados de *T. harzianum*

Os mutantes (TW5-2B1, TW5-2B2, TW5-2B6, TW5-410, TW5-523 e T95) foram selecionados para resistência ao fungicida Benomil, a partir dos isolados *T. harzianum* TW5 (coleção de culturas do CNPMA/EMBRAPA), e *T. harzianum* WT-T95 (dado pelo Dr. R. Baker), através do agente mutagênico ultravioleta.

Experimentos

Foram realizados três, sendo o terceiro a repetição do segundo. O primeiro (Experimento I) teve por objetivo observar o comportamento de mutantes de *T. harzianum* TW5 e WT-T95 como promotores de crescimento em plantas de alface.

Vasos de plástico (9 × 10 cm) foram preenchidos com

uma mistura de perlita e serrapilheira (*Sphagnum canadense*) (1:3, v/v), acrescida de 10% do composto à base de restos de algodoeiros e de indústria de papel (Cotton Burr Compost, Back to Earth Resources Inc., Texas), pH 5,0. O preparo do inóculo dos mutantes seguiu o procedimento descrito por WINDHAM et alii (1986) e a inoculação deu-se misturando vigorosamente o inóculo ao substrato, de forma a obter a concentração 10^5 u.f.c. por grama de substrato. As plantas de alface (Rock Ford Seed Co., CO, EUA) foram transplantadas com 15 dias de idade. Após 45 dias, foram podadas e avaliado o peso de matéria fresca. Cada tratamento teve cinco repetições, com três plantas por vaso (parcela). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

O segundo e o terceiro experimentos tiveram por objetivo comparar o comportamento desses mutantes, como promotores de crescimento de plantas de alface, em presença ou ausência dos fungicidas Benomil e Iprodione (usualmente empregados em culturas de alface). O procedimento seguiu o acima descrito. Para os tratamentos químicos, após 24 horas do transplante, 40 ml das suspensões dos fungicidas foram usadas para regar os vasos. As suspensões de Benomil e Iprodione foram preparadas nas concentrações de 1000 e 500 ppm, respectivamente. As plantas foram podadas após 45 e 30 dias (Experimentos II e III, respectivamente). As avaliações deram-se pelo peso de matéria fresca. Cada tratamento teve cinco repetições, com três plantas por vaso (parcela). O experimento foi realizado duas vezes (Experimentos II e III). O delineamento experimental foi o fatorial em blocos ao acaso.

RESULTADOS

A análise estatística do Experimento I detectou diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) no comportamento dos mutantes como promotores de crescimento em plantas de alface em condições de casa de vegetação (TABELA 1). Os mais altos pesos de matéria fresca foram obtidos na presença do mutante TW5-2B2. Este, porém, diferiu

significativamente dos mutantes TW5-2B1, TW5-2B6 e T95, os quais não diferiram entre si, como também dos demais mutantes, das linhagens parentais ou controle. Verifica-se, pois que, mesmo frente a altas doses dos fungicidas Benomil e Iprodione, observou-se resposta positiva de alguns dos mutantes quando comparados com as linhagens selvagens *T. harzianum* TW5 e WT-T95 e o Controle.

TABELA 1. Comportamento de mutantes de *T. harzianum* TW5 e WT-T95 como promotores de crescimento em plantas de alface (Experimento I).

Mutantes	Peso de Matéria Fresca (mg)	Mutantes	Peso de Matéria Fresca (mg)
TW5	76,77 bc	TW5-523	72,19 c
TW5-2B1	85,03 ab	WT-T95	78,25 bc
TW5-2B2	92,86 a	T95	81,91 abc
TW5-2B6	84,34 ab	Controle	77,47 bc
TW5-410	76,01 bc		

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Cada número representa a média de 5 repetições contendo 3 plantas por vaso.

$\Delta = 18,133$

As análises de variância dos Experimentos II e III detectaram diferenças altamente significativas para Mutantes, Fungicidas e para a Interação Mutantes \times Fungicidas. O teste de Tukey ($P < 0,05$) comprovou diferenças significativas entre os mutantes na ausência ou presença dos fungicidas, assim como para cada mutante entre os tratamentos (TABELAS 2 e 3). Na ausência dos fungicidas, os maiores pesos de matéria fresca foram obtidos com os mutantes TW5-2B2, TW5-2B6 e T95, para o Experimento II, e TW5-2B1, TW5-2B2, TW5-2B6, TW5-410, TW5-523 e linhagem selvagem WT-T95,

para o Experimento III. Na presença do fungicida Benomil, somente no Experimento III foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, com destaque para os mutantes TW5-2B6, TW5-410, TW5-523 e T95. Em presença de Iprodione, no Experimento II, o melhor resultado foi obtido com o mutante TW5-2B6, enquanto que para o Experimento III, destacaram-se TW5-2B6, TW5-410, T95 e linhagem selvagem *T. harzianum* WT-T95.

Quanto ao comportamento de cada um dos mutantes na ausência ou presença dos fungicidas, foram também detectadas diferenças significativas, com exceções para TW5-2B1, TW5-2B6, WT-T95, no Experimento II, e para o Controle, no Experimento III. Para a linhagem selvagem TW5 e o mutante TW5-2B2, no Experimento II, a linhagem selvagem TW5, TW5-2B1, TW5-2B2, TW5-2B6 e TW5-410, no Experimento III, foram detectadas diferenças significativas entre o tratamento com Iprodione e os demais tratamentos, os quais não diferiram entre si. Ainda no Experimento I, para o mutante TW5-410 observou-se diferença significativa entre o tratamento Iprodione e os demais, os quais não diferiram entre si. O mutante TW5-523 exibiu diferenças significativas entre os tratamentos em presença dos fungicidas, porém estes não diferiram do tratamento sem fungicida. Para o mutante T95, foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos ausência e presença de fungicidas, os quais não diferiram entre si. O Controle mostrou diferenças significativas entre todos os tratamentos. No Experimento III, na presença do mutante T95 surgiram diferenças significativas entre os tratamentos. Para o mutante TW5-410 foram detectadas diferenças significativas entre o tratamento Benomil e os demais, os quais não diferiram entre si. Já o mutante TW5-523 não mostrou diferença significativa entre os tratamentos com fungicidas, porém estes diferiram do tratamento ausência de fungicida.

Embora a presença dos mutantes tenha proporcionado respostas positivas em vários dos tratamentos, os dois Experimentos não exibiram um comportamento muito semelhante, provavelmente pelo fato de o Experimento III ter sido interrompido alguns dias antes.

TABELA 2. Comportamento de mutantes de *T. hatzianum* TW5 e WT-T95 como promotores de crescimento em plantas de alfafa, na presença ou ausência de Benomil e Iprodione. Médias de 5 repetições.

Mutantes	Peso de Matéria Fresca (mg)					
	Experimento II ($\Delta = 8,11$)		Experimento III ($\Delta = 9,15$)			
	Controle	Benomil	Iprodione	Controle	Benomil	Iprodione
TW5	62,53 aBC	65,33 aAB	53,35 bDE	20,44 aC	22,42 aDE	12,95 bC
TW5-2B1	67,75 aAB	70,80 aA	72,36 aA	22,12 aBC	27,52 aCDE	13,53 bC
TW5-2B2	71,16 aA	67,18 aAB	59,72 bCD	32,57 aA	29,00 aCD	21,13 bABC
TW5-2B6	68,24 aAB	65,82 aAB	66,70 aABC	34,21 aA	40,52 aAB	26,00 bA
TW5-410	67,56 abAB	61,83 bB	68,75 aAB	25,89 aABC	31,78 aBC	17,05 bABC
TW5-523	65,63 abAB	70,19 aA	60,93 bBCD	30,82 bAB	41,83 aA	24,69 bAB
WT-T95	67,93 aAB	64,46 aAB	68,87 aAB	26,83 aABC	19,02 bE	13,53 bC
T95	65,05 bABC	67,65 abAB	73,65 aA	32,79 bA	42,64 aA	17,25 cABC
Controle	57,13 bC	63,82 aAB	46,99 cE	22,32 aBC	20,98 aDE	15,43 aBC

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

O potencial de *T. harzianum* de induzir o crescimento de plantas ornamentais e hortícolas tem sido relatado. Os dois mecanismos mais importantes na indução do crescimento de plantas por *Trichoderma* spp. estão relacionados tanto com o controle indireto dos patógenos menores, ou seja, microrganismos cuja presença nas pontas das raízes ou células corticais tem efeitos deletéricos às plantas, como com a excreção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas (BAKER, 1989).

As possibilidades do emprego de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole tem sido bastante estudada, porém são poucas as pesquisas sobre estes agentes como indutores de crescimento em plantas. Apesar de os mutantes *T. harzianum* TW5 e WT-T95 não terem sido selecionados para esta finalidade, os resultados aqui obtidos mostraram atuação positiva de alguns destes mutantes como promotores de crescimento de plantas de alface, na ausência ou na presença dos fungicidas Benomil e Iprodione.

Os resultados aqui apresentados corroboram com alguns trabalhos relatados na literatura. LINDSEY & BAKER (1967) foram os primeiros a mostrar aumento no crescimento de plantas na presença de *T. viride*, em condições de laboratório. BAKER et alii (1984) observaram 274% de aumento no peso de matéria seca de plantas de rabanete tratadas com o mutante *T. harzianum* T95. WINDHAM et alii (1986) observaram que a adição de *T. harzianum* T95 e T12 e *T. koningii* T8, ao solo autoclavado, aumentou tanto a taxa de emergência como o peso de matéria seca das raízes e caules em plantas de tomate e fumo, 213-275 e 259-318%, respectivamente. Em solo natural, *T. harzianum* T95 diferiu do controle e proporcionou aumento no peso de matéria seca de plantas de rabanete. CHANG et alii (1986) utilizando solo natural, observaram a antecipação de dois dias na germinação de sementes de pimenta. Em solo natural ou pasteurizado, *T. harzianum* T95 aumentou o número de botões por planta de crisântemo, de petúnia e outras. Houve aumento significati

vo do peso de matéria seca em plantas de tomate, pimenta e pepino, quando plantadas em presença de *T. harzianum* T203, em solo arenoso vermelho/marrom. Entretanto, respostas positivas no crescimento, na presença do agente de biocontrole, não ocorreram em todos os casos.

PAULITZ *et alii* (1990) observaram que *T. harzianum* T95 levou a um aumento no peso de matéria seca de plantas de pepino quando foi empregado em solo do Colorado, natural ou pasteurizado, mas não quando estes tratamentos foram suplementados com folhas de feijão. Em solo do Oregon, sementes tratadas com T95 foram afetadas apenas em solos pasteurizados.

LYNCH *et alii* (1991) observaram que os isolados *T. harzianum* IMI 298374 e *T. harzianum* WT exibiram diferenças significativas nas porcentagens de emergência de plântulas de alface e no peso de matéria seca, aos 25 dias. Os autores contrastaram estes resultados com os obtidos por BAKER (1989), em que foi obtido pequeno efeito benéfico na promoção do crescimento das plantas de ervilha e rabanete.

Como comentaram PAULITZ *et alii* (1987) ainda continua desconhecido se são as diferentes misturas de solo que afetam a receptividade das plantas aos produtos promotores de crescimento produzidos por *Trichoderma* spp., ou se os fungos são influenciados por metabólitos secundários. Como se vê, quase nada se conhece sobre o comportamento de linhagens selvagens ou de mutantes induzidos de agentes de biocontrole de fitopatógenos, como promotores de crescimento de plantas em presença de fungicidas. Os resultados obtidos com os mutantes de *T. harzianum* TW5 e WT-T95, que exibiram características de promotores de crescimento de plantas de alface, sinaliza um novo campo de estudo.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de mutantes de *Trichoderma harzianum* TW5 e WT-T95, selecionados para resistência ao Benomil, como promotores de cres-

cimento em plantas de alface, na ausência ou presença dos fungicidas Benomil e Iprodione. O substrato consistiu de uma mistura de serrapilheira e perlita (1:3), acrescida de 10% de um composto à base de restos de algodoeiros e de indústria de papel. A inoculação dos mutantes deu-se misturando vigorosamente o inóculo ao substrato, de forma a obter-se a concentração 10^5 u.f.c. por grama de substrato. As plantas de alface foram transplantadas com 15 dias de idade; Para os tratamentos com fungicidas, cada vaso recebeu 40 ml das suspensões de Benomil ou Iprodione, 1000 e 500 ppm, respectivamente. As avaliações deram-se pelo peso de matéria fresca. Os mutantes comportaram-se como promotores de crescimento de plantas de alface, especialmente o TW5-2B2, seguido por TW5-2B1, TW5-2B6 e T95.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, resistência, Benomil, Iprodione, promotores de crescimento, alface.

SUMMARY

Trichoderma harzianum AS GROWTH PROMOTER ON LETTUCE PLANTS

The objective of this research was to evaluate the behavior of Benomyl resistant mutants of *T. harzianum* TW5 (TW5-2B1, TW5-2B2, TW5-2B6, TW5-410 and TW5-523) and *T. harzianum* WT-T95 (T95) as plant growth promoter on lettuce plants, in absence or presence of Benomyl or Iprodione fungicides. The substrate used was nonsterile Canadian sphagnum peat moss and perlite (1:3, v/v), amended with cotton burn compost (10%). Mutants were applied as peat-bran preparation added to substrate, and the final population density was adjusted to 10^5 cfu/g. Benomyl and Iprodione fungicides solution were applied by drench to give the final concentration 1000 and 500 ppm, respectively. Most of resulting plants produced significantly higher fresh weights than controls, either in absence or presence of Benomyl or Iprodione fungicides, specially TW5-2B2 followed by TW5-2B1, TW5-2B6 and T95.

Key words: *Trichoderma harzianum*, resistant, Benomyl, Iprodione, plant growth response, lettuce plant.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, J.S. & R. BAKER, 1987. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, 77: 182-89.
- BAKER, R., 1987. *Trichoderma* spp. as Plant Growth Stimulants. **CRC Critical Reviews**, 7: 97-106.
- BAKER, R., 1989. Improved *Trichoderma* spp. for Promoting Crop Productivity. **Trends in Biotechnology**, 7: 34-38.
- BAKER, R., 1991. Induction of Rhizosphere Competence in the Biocontrol Fungus *Trichoderma*. In: KUSTER, D.L. & PAPAIVIZAS, G.C. **The Rhizosphere and Plant Growth**. Netherland, Kluwer Academic Publ. p. 221-228.
- BAKER, R.; Y. ELAD & I. CHET, 1984. The Controlled Experiments in the Scientific Method with Special Emphasis on Biological Control. **Phytopathology**, 74: 1019-1021.
- BAKER, R.; T. PAULITZ; M.H. WINDHAM; Y. ELAD, 1986. Enhancement of Growth of Ornamentals by a Biological Control Agent. **Colorado Greenhouse Growers Association Bull.**, 431: 1-7.
- CHANG, Y.; Y. CHANG; R. BAKER; O. KLEIFELD; I. CHET, 1986. Increased Growth of Plants in the Presence of the Biological Control Agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, 70: 145-148.
- LINDSEY, D.L. & R. BAKER, 1967. Effect of Certain Fungi on Dwarf Tomatoes Grown under Gnotobiotic Conditions. **Phytopathology**. 57: 1262-1263.
- LUMSDEN, R.D. & J.A. LEWIS, 1989. Selection, Production, Formulation and Commercial Use of Plant Disease Biocontrol Fungi: Problems and Progress. In: WHIPPS, J.M. & LUMSDEN, R.D. (eds.). **Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. Cambridge, Cambridge Univ. Press. p. 171-190.
- LYNCH, J.M.; K.L. WILSON; M.A. OUSLEY; J.M. WHIPPS, 1991. Response of Lettuce to *Trichoderma* Treatment. **Letters in Applied Microbiology**, 12: 59-61.
- PAPAIVIZAS, G.C., 1982. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Bio-

- logy, Ecology and Potential for Biocronrol. **Annual Review of Phytopathology**, **23**: 23-54.
- PAPAVIZAS, G.C.; J.A. LEWIS & A.E. MOITY, 1982. Evaluation of New Biotypes of *Trichoderma harzianum* for Tolerance to Benomyl and Enhance Biocontrol Capabilities. **Phytopathology**, **72**: 126-132.
- PAULITZ, T.C.; J.S. AHMAD & R. BAKER, 1990. Integration of *Phythium numm* and *Trichoderma harzianum* Isolate T-95 for the Biological Control of *Pythium damping-off* of Cucumber. **Plant and Soil**, **121**: 243-250.
- WINDHAM, M.T.; Y. ELAD & R. BAKER, 1986. A Mechanism for Increased Plant Growth Induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, **776**: 518-521.