

Efeito da formulação em diferentes óleos vegetais e surfactantes na germinação de conídios de *Trichoderma harzianum* LCB 47

Effect of oil based formulations and surfactants on the conidial germination of *Trichoderma harzianum* LCB 47

Katia Lisana Nascimento¹; Michelly Elen Leal Menezes²; Roselene Erlo³; Eliane S. Brito⁴; Ernando Ferreira Mota⁵, Carlos Alberto Tuão Gava⁶

Resumo

O desenvolvimento de formulações mais estáveis ao armazenamento e ao impacto das variáveis climáticas sobre os agentes de controle biológico (ACB) pode tornar mais usual a sua adoção no manejo de pragas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a formulação de conídios de isolados de *Trichoderma harzianum* LCB47 em óleos vegetais e, conseqüentemente, a adoção de agentes dispersantes para o preparo de caldas para a aplicação. A adoção de formulação em óleo vegetal reduziu a germinação de conídios, quando comparada com a extração direta em água destilada estéril. O óleo de milho foi o que apresentou maior eficiência na transferência dos conídios de LCB 47, embora tenha apresentado a menor taxa de germinação. A adição de agentes dispersantes

¹Estudante de Biologia, Bolsista FACEPE/Embrapa Semi-Árido, Cx. Postal 23, 56302-970, Petrolina-PE; ²Bióloga, CNPq/Embrapa Semi-Árido; ³Química de Alimentos, Bolsista CNPq; ⁴Eng^a Agr^a, Estudante de Doutorado, Bolsista CAPES/Embrapa Semi-Árido; ⁵Estudante de Biologia, Laboratorista da Embrapa Semi-Árido; ⁶Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, gava@cpatsa.embrapa.br

resultou na redução da germinação dos conídios e a adição de Tween-80 0,25% apresentou os melhores resultados, combinando a melhor dispersão dos conídios e taxa de germinação.

Palavras-chaves: controle biológico, formulação, agentes dispersantes.

Introdução

A resistência dos patógenos aos princípios ativos disponíveis e os efeitos ambientais negativos têm demandado esforços consideráveis em busca de alternativas de controle, ambiental e socialmente aceitáveis. Neste contexto, o controle biológico tem se apresentado como uma das alternativas ao uso de fungicidas e de outros pesticidas.

Espécies de fungos do gênero *Trichoderma* são os mais estudados agentes de controle biológico de doenças, tendo sido avaliados no controle de patógenos do solo (Chet, 1987), parte aérea (Elad et al., 1993, Harman et al., 1996), tanto no campo quanto em cultivo protegido (Hjeljord et al., 2000) e, ainda, como proteção pós-colheita (Mortuza & Ilag, 1999). Em condições de campo, os resultados obtidos têm sido inconsistentes para o controle biológico e manejo integrado de doenças (Gulino, 1992).

Fatores como temperatura e umidade relativa e a disponibilidade de nutrientes, podem interferir no sucesso do agente de controle (Hjeljord et al., 2000) e tais problemas podem ser minimizados pela adoção de formulações adequadas. Uma das alternativas tem sido a adoção de formulações em óleo vegetal com ou sem o uso de adjuvantes.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência de óleos vegetais e tensoativos a serem utilizados na preparação de caldas para a aplicação em campo de formulações em óleo de *Trichoderma*.

Material e Métodos

Os conídios de *Trichoderma harzianum* LCB 47 foram produzidos em erlenmeyers contendo arroz parboilizado com 30% de umidade e incubação em câmaras de germinação (BOD) à temperatura de 28°C por 15 dias. Após este período, os conídios foram removidos dos grãos de arroz pela adição de óleo vegetal em agitação constante seguida de filtração. Utilizando este procedimento, os conídios foram transferidos para óleo de algodão refinado, girassol, milho e soja.

No experimento, para avaliação da germinação dos conídios em função da utilização de tensoativos alíquotas de 1 mL de suspensões em óleo a 1×10^5 conídios.mL⁻¹ foram preparadas em água, utilizando os diferentes tensoativos. Foram avaliadas as seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1% de Tween 20, Triton ou Óleo mineral parafínico (OMP). Um dos tratamentos utilizou a extração em água destilada autoclavada em substituição ao óleo e a dispersão nos diferentes tensoativos.

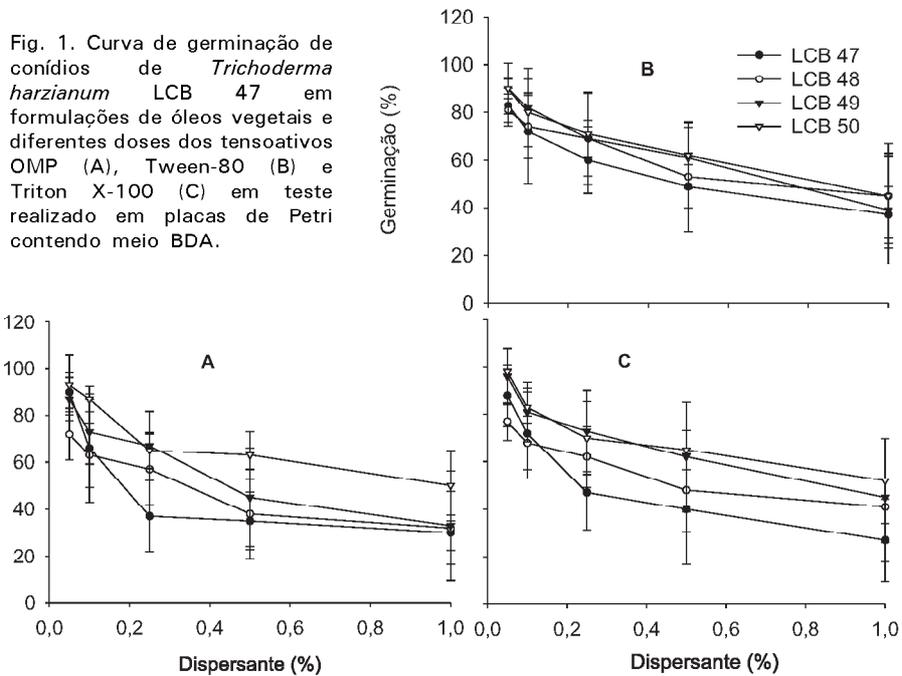
As suspensões de esporos foram aplicadas sobre placas de Petri, contendo meio BDA por atomização, utilizando torre de Potter e transferidas para câmaras de germinação com 80% UR e 25°C por 24 horas. Foram observados cinco campos óticos, contabilizando um número mínimo de 300 conídios por placa. Os conídios foram considerados germinados quando o tubo germinativo alcançou comprimento igual ou superior ao seu diâmetro em observação em microscópio ótico.

A taxa de germinação (G%) foi definida utilizando-se a germinação em água como referência através da fórmula $= (G_{\text{óleo}}/G_{\text{H}_2\text{O}}) \times 100$, onde: $G_{\text{óleo}}$ é a germinação em óleo e $G_{\text{H}_2\text{O}}$, a germinação em água. Para fins de análise de variância, taxa de germinação calculada foi transformada utilizando-se a fórmula $Y = \arcseno G\%$ de forma a alcançar distribuição normal dos dados. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial com 3 surfactantes e 4 tipos de óleos vegetais. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Statistica for Windows (Statsoft Inc., USA). Tratamentos com efeitos significativos a 5% pelo teste de F foram analisados por regressão linear.

Resultados e Discussão

A formulação em óleo vegetal resultou em menor taxa de germinação quando comparada a água pura logo após a extração ($F_{3;38} = 7,32$, $P = 0,012$). Embora o óleo de milho apresente a menor viscosidade quando comparado aos demais, apresentou a menor taxa de germinação dos conídios após a transferência para placas de Petri contendo meio BDA. Observações realizadas nos conídios não germinados em microscopia ótica mostraram a existência de um filme de óleo na superfície dos conídios, limitando sua hidratação, etapa inicial do processo germinativo, o que limita a germinação.

O óleo de milho apresentou maior eficiência na remoção de conídios da superfície dos grãos de arroz, provavelmente devido à sua menor viscosidade. No entanto, a formulação em óleo resultou na formação de grumos de conídios, que poderiam reduzir a eficiência de espalhamento durante a aplicação em campo bem como promover o entupimento de bicos dos equipamentos. No experimento, verificou-se que a elevação da concentração dos agentes dispersantes (tensoativos) causaram redução significativa da germinação dos conídios após 24 horas de incubação em meio BDA (Fig. 1).



As doses dos agentes dispersantes apresentaram efeito linear quadrático sobre a germinação dos conídios de LC B47. O OMP apresentou germinação de apenas 60% dos conídios a partir da dose 0,25%, estabilizando-se ao redor de 40% e inviabilizando seu uso. A concentração mais baixa dos dispersantes Tween-80 e Triton X-100 resultaram em uma dispersão insuficiente dos conídios, permanecendo uma elevada proporção de grumos. Os melhores resultados foram alcançados com uma dose de 0,25% de Tween-80 (Fig. 1). Nesta concentração, a dispersão dos conídios foi adequada à aplicação e a taxa de sobrevivência de conídios foi superior a 70%. A partir desta dose, os óleos de girassol e milho apresentaram maior taxa de inviabilidade dos conídios, como pode ser verificado por um maior valor do coeficiente b_0 da equação de regressão linear (Tabela 1).

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que o óleo de milho foi o mais eficiente para a extração dos conídios. No entanto, houve maior mortalidade dos conídios aos dispersantes nas formulações obtidas. O Tween-80 a 0,25% apresentou o melhor efeito dispersante sobre os conídios formulados em óleo.

Tabela 1. Equações de regressão linear mostrando o efeito de diferentes - agentes dispersantes sobre a germinação de conídios de *Trichoderma harzianum* LCB 47 em formulações de óleos vegetais.

	Equação de regressão	R ²	F	P
OMP				
Algodão	$\hat{y} = 89,68 - 197,09x + 138,91x^2$	0,86	16,38	0,035
Girassol	$\hat{y} = 75,63 - 101,06x + 57,23x^2$	0,98	49,49	0,020
Milho	$\hat{y} = 89,54 - 117,66x + 61,03x^2$	0,97	37,32	0,026
Soja	$\hat{y} = 95,733 - 106,28x + 61,34x^2$	0,92	12,07	
Tween 80				
Algodão	$\hat{y} = 84,65 - 103,62x + 56,32x^2$	0,98	44,30	0,021
Girassol	$\hat{y} = 83,98 - 80,08x + 40,94x^2$	0,98	62,56	0,016
Milho	$\hat{y} = 91,09 - 80,10x + 28,46x^2$	0,98	46,57	0,021
Soja	$\hat{y} = 90,29 - 76,37 + 31,43x^2$	0,97	39,10	0,025
Triton X-100				
Algodão	$\hat{y} = 89,90 - 162,62x + 100,73x^2$	0,94	24,76	0,034
Girassol	$\hat{y} = 79,13 - 85,45x + 47,31x^2$	0,98	55,75	0,018
Milho	$\hat{y} = 95,17 - 92,04x + 42,29x^2$	0,95	21,49	0,044
Soja	$\hat{y} = 96,91 - 1010,93x + 56,76x^2$	0,92	11,12	0,082

R² = coeficiente de determinação da regressão; F = valor de F obtido na análise de variância; P = probabilidade de significância para o teste de F.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa e ao FUNDECI/BNB, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Referências Bibliográficas

- CHET, I. *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborn plant pathogenic fungi. In: CHET, I. (Ed.). **Innovative approach to plant disease control**. New York: John Wiley, 1987. p. 137-160.
- ELAD, Y.; ZIMAND, G.; ZAGS, Y.; ZURIEL, S.; CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould *Botrytis cinerea* under commercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, London, v. 42, p. 324 -332, 1993.
- GULINO, M. L. Control of *Botrytis* rot in grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. In: TJAMOS, E. C.; PAPAVIDAS, G. C.; COOK, R. J. (Ed.). **Biological control of plant diseases: progress and challenges for the future**. New York: Plenum, 1992. p.125-132. (NATO ASI Serie A: Life Sciences, 230).
- HARMAN, G. E.; LATORE, B.; AGOSTINI, E.; SAN MARTIN, R.; RIEGEL, D. G.; NIELSEN, P. A.; TRONSMO, A.; PIERSON, R. C. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. **Biological Control**, San Diego, v. 7, p. 259-266, 1996.
- HJELJORD, L. G.; STEVENSON, A.; TRONSMO, A. Effects of temperature and nutrients stress on the capacity of commercial products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. **Biological Control**, San Diego, v. 19, p. 149 -160, 2000.
- MORTUZA, M. G.; ILAG, L. L. Potential for biocontrol of *Lasioidiplodia theobromae* (Pat.) Giff & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. **Biological Control**, San Diego, v. 15, p. 235 -240, 1999.