



## EFEITO DA TEMPERATURA E FOTOPERÍODO NA ESPORULAÇÃO DE *Trichoderma* EM MEIO LÍQUIDO

JÉSSICA O. E SILVA<sup>1</sup>; NATALIA F. DOS SANTOS<sup>2</sup>; BERNARDO A.

HALFELD-VIEIRA<sup>3</sup>; MARCELO A. B. MORANDI<sup>3</sup>

Nº 12406

### RESUMO

*Trichoderma* é um dos agentes de controle biológico de doenças mais utilizados na agricultura, cuja produção de esporos é realizada industrialmente em meio sólido, pois sua esporulação em meio líquido é ainda um desafio. Neste contexto, a definição dos parâmetros capazes de promover maior produção de esporos em fermentação líquida vem sendo investigada. Portanto, o objetivo deste trabalho é estabelecer uma temperatura e fotoperíodo que sejam ótimos para obter maior produção de esporos com boa viabilidade. No ensaio utilizou-se um isolado de *Trichoderma asperellum* que foi cultivado em meio Czapek-Dox e sacarose como fonte de carbono com temperaturas de 15, 25 e 30°C entre fotoperíodos 0, 12 e 24 horas, sendo o arranjo fatorial 3x3. Um disco de micélio de *T. asperellum* foi colocado em frascos de 250ml onde permaneceram por um período de 7 dias em um agitador orbital. Para as avaliações foram quantificadas as concentrações de esporos, percentual de conídios viáveis, unidades formadoras de colônias e massa seca. As análises foram realizadas por meio de análise de variância e teste de Tukey a 5%. A temperatura de 30°C foi a melhor utilizada, independente do fotoperíodo. A temperatura de 25°C apresentou resultados significativamente similares a 30°C, exceto para a concentração de conídios, que foi menor. Para o teste de germinação os fatores avaliados não interferiram no ensaio.

<sup>1</sup> Bolsista do CNPQ: Graduação em Ciências Biológicas, UNIPINHAL, Espírito Sto do Pinhal-SP, e-mail: jessicaoliveira600@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduação Eng. Florestal, UNESP, Botucatu-SP.

<sup>3</sup> Pesquisadores: Embrapa Meio Ambiente, CP 69, 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil.



## ABSTRACT

*Trichoderma* is one of the most widely used biocontrol agents in agriculture, whose spore production is manufactured in solid media, because its sporulation in liquid media is still a challenge. In this context, the definition of parameters which are able to promote wider yield of spores in liquid fermentation has been investigated. Therefore, the objective of this work is to establish an ideal temperature and photoperiod to produce spores with good viability. In treatments, a *Trichoderma asperellum* isolate cultivated in Czapek-Dox media and sucrose as a source of carbon with temperatures of 15, 25 and 30°C among photoperiods of 0, 12 and 24 hours being the factorial arrangement of 3x3 was used. A mycelium disk of *T. asperellum* was placed in the 250ml flasks where remained for a period of seven days on an orbital shaker. For the evaluation were quantified the spore concentrations, viable conidial percentage, colony forming units and dry weight. The analyzes were performed by analysis of variance and Tukey test at 5%. The temperature of 30°C was the best utilized, regardless of photoperiod. The temperature of 25°C was significantly similar to 30°C, except for the concentration of conidia, that was lower. For the germination test the evaluated factors do not interfere in the experiment.

## INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos para controle de doenças de plantas vem causando inúmeros problemas ambientais, como a resistência dos patógenos aos produtos químicos, desequilíbrio ambiental, contaminação do solo, água, eliminação de organismos benéficos, entre outros. Diante destes problemas, inúmeros métodos de controle têm sido estudados, dentre eles, o controle biológico se destaca como um dos mais promissores (BETTIOL & MORANDI, 2009).

No entanto, a produção de produtos de controle biológico em larga escala tem em especial problemas de formulação, que levam a uma vida de prateleira curta desses agentes de biocontrole, que ainda têm sido fatores limitantes à expansão da indústria destes produtos. A logística empregada nessa área e em muitos casos, as condições ambientais requeridas para a armazenagem de tais produtos geram outro entrave no ramo (LOPES, 2009; POMELLA & RIBEIRO, 2009).

Dentre os inúmeros microrganismos que são utilizados em larga escala como agentes de controle biológico, os fungos do gênero *Trichoderma* se destacam por apresentarem mecanismos de antagonismos diversos, como antibiose, competição, colonização de raízes e/ou substrato e indução de crescimento (BEDENDO et al.,



2011; HARMAN et al., 2004; HOWELL, 2003; LORITO 2010; SCHIRMBOCK et al., 1994).

Estes fungos apresentam crescimento ótimo em temperaturas entre 25°C e 28°C e alta umidade relativa (BONFIM et al., 2010), mas podem crescer em níveis de umidade entre 55% e 70% (LATIFIAN et al., 2007). Temperaturas entre 10°C e 17°C diminuem o crescimento micelial de forma significativa (BONFIM et al., 2010). Em relação ao fotoperíodo, muitos autores (BONFIM et al., 2010; ETHUR et al., 2008; LOUZADA et al., 2009) utilizam 12 h luz/12 h escuro em câmara de incubação para *Trichoderma*.

Na produção massal de produtos à base de *Trichoderma*, as indústrias utilizam normalmente a fermentação em meio sólido, em substratos como arroz, sorgo, trigo ou fubá, por serem de fácil manipulação e de baixo custo (SINGHT et al., 2007). Entretanto, neste tipo de meio, há menor controle da padronização do substrato (HOLKER et al., 2004) e também maior dificuldade de separação dos esporos.

A substituição do meio sólido por meios líquidos é um método eficiente e promissor para contornar os problemas encontrados na fermentação sólida, bem como a diminuição dos custos de produção. Outra vantagem para a adoção de meios líquidos é a relativa facilidade técnica no processo de separação dos conídios e na extração do excesso de água, realizado para manter os propágulos com aproximadamente 10% de água total, aumentando assim o tempo de vida de prateleira dos produtos (BATTA, 2004).

Portanto, este trabalho visa continuar um processo de padronização de condições para fermentação líquida de *Trichoderma*, adequando a temperatura e o fotoperíodo para obter uma maior esporulação do fungo em meio líquido.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para o cultivo, utilizou-se o meio líquido Czapek-Dox modificado. As temperaturas foram 15, 25 e 30°C com fotoperíodo de 0, 12 e 24 horas, utilizando arranjo fatorial 3x3 com 5 repetições de cada tratamento. Em cada frasco de 250ml foram colocados 120ml do meio, que foram esterilizados em autoclave por vinte minutos a 121°C. Após o resfriamento, foi adicionado um disco de micélio de um isolado de *Trichoderma asperellum* e levados em agitador orbital com regulagem de temperatura e fotoperíodo onde permaneceram por sete dias. Decorridos o período de agitação, uma alíquota do meio foi retirada e levada para câmara de Neubauer para quantificação dos esporos e posterior diluição para teste de germinação e contagem



de unidades formadoras de colônia (UFC). Ao final, a massa seca total do crescimento fúngico foi medida.

Para a análise de germinação dos esporos, foram utilizadas placas de Petri contendo meio BDA (200 ml caldo de batata; 800 ml H<sub>2</sub>O destilada; 16g Agar e 20g dextrose). Cada placa foi subdividida em duas partes iguais, sendo que em cada parte foram adicionados 15 µL de suspensão de esporos numa concentração de 10<sup>4</sup> esporos/ml, perfazendo um total de cinco gotas de suspensão em cada divisão da placa. Em seguida as placas foram mantidas em câmara de incubação a 25°C por quinze horas em fotoperíodo de 24 horas. Decorridos esse período, adicionou-se azul de lactofenol para a paralisação da germinação. Para a avaliação, foram contados com auxílio de microscópio ótico os esporos germinados e não germinados, totalizando de 100 esporos por gota.

Para a avaliação das unidades formadoras de colônia (UFC), foi utilizado o meio BDA adicionado 10µL de Triton<sup>®</sup>, sendo este composto utilizado como redutor de crescimento das colônias. Para esta avaliação utilizou-se três placas de Petri com o meio para cada tratamento e em cada placa foram adicionados 100 µL de suspensão de esporos de *T. asperellum* numa concentração de 10<sup>3</sup> esporos/ml. A suspensão foi distribuída na superfície da placa com o auxílio de alça de Drigalski. As placas foram, então, mantidas em câmara de incubação a 25°C por quarenta e oito horas aproximadamente. A avaliação foi feita a olho nu pela contagem das colônias do fungo formadas após o período de incubação.

Para a avaliação da massa seca, foram utilizados filtros de papel de café, que primeiramente foram secos em estufa a 55°C e pesados. Após este procedimento, o meio líquido contido nos frascos foram filtrados e o material seco nas condições mencionadas acima. Após a secagem, os filtros foram novamente pesados. A massa seca do fungo foi quantificada pela diferença de massa após a filtração do meio e a massa do filtro antes da filtração.

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância em esquema fatorial e teste de Tukey a 5%, por meio do programa SAS versão 9.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação de massa seca a temperatura de 25°C produziu em média 0,19 g sendo a que apresentou melhor resultado, no entanto, não diferiu estatisticamente do tratamento de 30°C que produziu em média 0,18 g. A massa seca



foi drasticamente reduzida a temperatura de 15°C desfavorecendo o crescimento do agente de controle biológico.

O fotoperíodo não apresentou ganho de massa seca em nenhum dos tratamentos realizados. A única exceção foi na luminosidade de 12 h a temperatura de 15°C reduzindo a massa seca formada pelo fungo (Tabela 1).

**Tabela 1:** Teste de médias em esquema fatorial para o efeito de temperatura e fotoperíodo na formação de massa seca (gramas) de *Trichoderma*

Temperatura (Celsius)			
Fotoperíodo (Horas)	15°C	25 °C	30 °C
0 h	0,08 g Ab	0,18 g Aa	0,17 g Aa
12 h	0,05 g Bb	0,20 g Aa	0,18 g Aa
24 g	0,08 g Ab	0,164 g Aa	0,19 g Aa

Letras maiúsculas = comparação no sentido da coluna, letras minúsculas = comparações no sentido da linha.

A temperatura de 30°C foi a que apresentou maior produção de conídios, superando a ordem de  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de meio, mas a temperatura de 25°C também produziu boa quantidade de conídios não diferindo estatisticamente de 30°C (Tabela 2). Para a temperatura de 15°C houve uma grande redução na produção de conídios na escala de 10 vezes menos.

O fotoperíodo não foi capaz de proporcionar nenhum ganho significativo na produção de conídios de *Trichoderma asperellum*.

**Tabela 2:** Teste de médias em esquema fatorial para o efeito de temperatura e fotoperíodo na produção de conídios de *Trichoderma*

Temperatura (Celsius)			
Fotoperíodo (Horas)	15°C	25°C	30°C
0 h	40.000 Ab	933.000 Ab	12.316.000 Aa
12 h	115.000 Ab	880.000 Ab	6.836.000 Aa
24 h	80.000 Ab	1.322.000 Ab	6.621.000 Aa

Letras maiúsculas = comparação no sentido da coluna, letras minúsculas = comparações no sentido da linha.



No teste de unidades formadoras de colônia (UFC), a temperatura de 30°C apresentou maior quantidade de colônias formadas, mas não houve diferença estatística para o tratamento 25°C (Tabela 3).

O fotoperíodo não proporcionou nenhum aumento no número de colônias formadas.

**Tabela 3:** Teste de médias em esquema fatorial para o efeito de temperatura e fotoperíodo na formação de unidade formadora de colônia (UFC) de *Trichoderma*

Fotoperíodo (Horas)	Temperatura (Celsius)		
	15°C	25°C	30°C
0 h	18,80 Aa	53,13 Aa	66,40 Aa
12 h	28,60 Aa	45,00 Aa	50,80 Aa
24 h	40,06 Aa	50,73 Aa	85,26 Aa

Letras maiúsculas = comparação no sentido da coluna, letras minúsculas = comparações no sentido da linha.

Para o teste de germinação, tanto a temperatura quanto o fotoperíodo não interferiram significativamente no resultados (Tukey 5%). Porém a temperatura de 15°C parece ter reduzido a germinação independentemente do fotoperíodo utilizado (Tabela 4).

**Tabela 4:** Teste de médias em esquema fatorial para o efeito de temperatura e fotoperíodo para germinação (%) de *Trichoderma*

Fotoperíodo (Horas)	Temperatura (Celsius)		
	15°C	25°C	30°C
0 h	74.52 Aa	93.82 Aa	99 Aa
12 h	69.96 Aa	99.59 Aa	98.78 Aa
24 h	49.85 Ab	98.30 Aa	97.13 Aa

Letras maiúsculas = comparação no sentido da coluna, letras minúsculas = comparações no sentido da linha.

## CONCLUSÃO

A temperatura de 30°C e 25°C tiveram os melhores resultados em todos os parâmetros avaliados, ao passo que, o tratamento de 15°C desfavoreceu o crescimento do agente de controle biológico.

No experimento o fotoperíodo não apresentou efeitos nos tratamentos.



## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

A Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de estágio.

## REFERÊNCIAS

BATTA, Y.A. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. **Crop Protection**, 23: 19-26, 2004.

BEDENDO, I.P.; MASSOLA, N.S.; AMORIM. Controles Cultural, Físico e Biológico de Doenças de Plantas. In AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A. (Ed). Manual de Fitopatologia: princípios e conceito. Volume 1. 4ªed. Editora Agronômica CERES Ltda, 2011.pp. 383-386.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle Biológico de doenças de Plantas no Brasil. In BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (ed.). Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. pp. 7-14.

BOMFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N. O. Antagonic effect in vitro and in vivo of *Trichoderma* spp. to *Rhizopus stolonifer* in yellow passion fruit. Summa phytopathologica. vol.36 no.1 Botucatu, 2010. ISSN 0100-5405.

ETHUR, L. Z.; NICOLLINI, S.; BLUMES, E. Viabilidade de formulações em pó de *Trichoderma virens* em diferentes embalagens e temperaturas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.14, n.2, p. 391-394, 2008

HARMAN, G.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological Advantages of Laboratory – scale Solid-state Fermentation with Fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64. p. 175-186. 2004.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease** 87: 4-10, 2003.

LATIFIAN, M.; ESFAHANI, Z. H.; BARZEGAR, M. Evolution of Culture conditions for cellulase production two *Trichoderma reesei* mutants under solid state fermentation conditions. **Bioresource Technology**. v.98, n.18, p.3634-3637, 2007.



- LOPES, R. B. A Indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (ed.). Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. Jaguariúna: Embrapa, 2009. pp. 15-23.
- LORITO, M. Translation Research on *Trichoderma*: from 'Omics to the Field. **Annual Review of Phytopathology**. v.48, n.1, p. 395-417, 2010.
- LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I. & BRAÚNA, L.M. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotrop** v.9, n.3, p. 145-149, 2009.
- POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S. Controle Biológico com *Trichoderma* em Grandes Culturas: Uma visão Empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (ed.). Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. Jaguariúna-SP: Embrapa, 2009. pp. 243.
- SINGH, A.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, H.B. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. 2007.