

*Anais*

# III CONGRESSO BRASILEIRO DE ROCHAGEM

**Editores**

Adilson Luis Bamberg

Carlos Augusto Posser Silveira

Éder de Souza Martins

Magda Bergmann

Rosane Martinazzo

Suzi Huff Theodoro



# AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* EM PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES INORGÂNICAS E ORGÂNICAS

Yasmin dos Santos Lourenço<sup>1</sup>; Glaucia de Figueiredo Nachtigal<sup>2</sup>;  
Carlos Augusto Posser Silveira<sup>3</sup>; Rosane Martinazzo<sup>4</sup>; Adilson Luís Bamberg<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - UFPel - yasminsantos2@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado - glaucia.nachtigal@embrapa.br; <sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado - augusto.posser@embrapa.br; <sup>4</sup>Embrapa Clima Temperado - rosane.martinazzo@embrapa.br; <sup>5</sup>Embrapa Clima Temperado - adilson.bamberg@embrapa.br

**Resumo:** O objetivo do presente trabalho foi avaliar através de ensaios *in vitro* o desenvolvimento de linhagens de *Trichoderma spp.* na presença de diferentes fontes inorgânicas e orgânicas com o intuito de verificar qual influência estes materiais possuem sobre a atividade deste gênero fúngico. O delineamento experimental compreendeu um fatorial 11 x 5, com três repetições, sendo os fatores representados por a) adição de diferentes fontes orgânicas e inorgânicas ao meio de cultura mínimo (com 11 níveis: Testemunha- meio mínimo puro; Lodo de água; Composto Ecocitrus; Basalto; Carbonatito Três Estradas; Dacito Itaara; Finos de Xisto; Fonolito-mineração Curimbaba; Granodiorito; MBR8; Xisto Retortado) e b) isolados de *Trichoderma spp.* (com cinco níveis: CPACT103; CPACT 124; CPACT 450; CPACT 630; CPACT 647). Foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial radial com auxílio de régua milimetrada, pelo período de quatro dias. No 15º dia procedeu-se à estimativa da concentração de esporos em microscópio óptico. Verificou-se a existência de comportamento diferenciado entre os isolados de *Trichoderma spp.* frente às diferentes fontes avaliadas. Os agrominerais diminuem a velocidade do crescimento micelial inicial, o qual se iguala ao tratamento testemunha aos sete dias de incubação. A maioria dos agrominerais proporciona desempenho superior à testemunha na esporulação dos isolados.

**Palavras-chave:** Agrominerais; Atividade microbiana; Microrganismo de solo.

## INTRODUÇÃO

A produção agrícola no Brasil é consideravelmente dependente da utilização de fertilizantes. Estes, por sua vez, imprimem custo elevado na produção e oferecem riscos ao equilíbrio do meio ambiente, principalmente quando são aplicados de maneira errônea, pois exercem efeitos deletérios sobre vários componentes da biosfera (ARBIETO, 2005; KABATA-PEN-DIAS, 2001).

O aproveitamento das rochas como fontes restituidoras de nutrientes para as plantas, recuperadora e renovadora do solo configura uma tecnologia alternativa capaz de auxiliar na redução do uso de fertilizantes de elevada concentração e solubilidade, caso da maioria das fontes usadas em formulações N, P e K (THEODORO, 2000).

A aplicação desses materiais no solo influencia a atividade de micro-organismos que, por sua vez, afetam o potencial produtivo do solo e estão diretamente relacionados ao seu aproveitamento na agricultura. (NETO; SOUZA, 2000). Os fungos do gênero *Trichoderma* spp. são micro-organismos de solo, não patogênicos, habitualmente estudados como agentes de controle biológico de doenças de plantas e, mais recentemente, como promotores de crescimento das mesmas (OLIVEIRA, 2012). Possuem vários mecanismos de fitoestimulação, incluindo a capacidade de solubilização e disponibilização de nutrientes às plantas (BENÍTEZ et al., 2004). Fatores como temperatura, umidade, aeração, pH e teor de matéria orgânica influenciam a sobrevivência de *Trichoderma* no solo (ZUCCHI, 2010).

Pesquisas realizadas no âmbito do Projeto Xisto Agrícola identificaram remineralizadores de solos, fontes de macro e micronutrientes com potencial para o desenvolvimento de matrizes fertilizantes, os quais aplicados ao solo podem influir na atividade de micro-organismos benéficos como os do gênero *Trichoderma* spp.

Diante dessas considerações objetivou-se neste trabalho avaliar o crescimento micelial e a esporulação *in vitro* de linhagens de *Trichoderma* spp., em presença de diferentes matérias-primas de origem inorgânica e orgânica. Em última análise, buscou-se verificar a influência destas fontes minerais a diferentes linhagens fúngicas do gênero *Trichoderma*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na biofábrica localizada na Estação Experimental Cascata Embrapa Clima Temperado.

Para a condução deste bioensaio foram selecionadas cinco linhagens de *Trichoderma* spp. (CPACT450; CPACT630; CPACT647; CPACT124; CPACT103) pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse ao Controle Biológico de Pragas, vinculada à Embrapa Clima Temperado e oriundas de diferentes agroecossistemas da região Sul do país. Os isolados foram submetidos à técnica de cultura monospórica, a fim de garantir uniformidade genética.

A constituição das matérias-primas de origem inorgânica é apresentada nas Tabelas 1 e 2. Fontes orgânicas (Lodo de água proveniente da estação de tratamento de água de Santa Maria/RS e Composto Ecocitrus) foram inseridas como controles positivos, tendo em vista os pressupostos de uma maior facilidade de desenvolvimento desta espécie fúngica em presença de matéria orgânica.

**Tabela 1** – Composição dos agrominerais quanto aos teores de elementos maiores

Agromineral/Remineralizador	Teores de elementos maiores (%)										
	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	S	MnO	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Basalto	49,8	12,7	14,0	5,26	8,5	2,5	1,43	0,43	<0.02	0,20	0,004
Carbonatito Três Estradas	3,9	0,5	4,1	3,23	46,4	<0.01	0,05	3,96	0,07	0,22	0,009
Dacito Itaara	67,5	12,4	6,0	0,72	2,2	2,4	4,63	0,22	<0.02	0,22	<0.002
Finos de xisto	48,1	12,9	6,1	2,14	4,7	1,3	1,76	0,21	3,26	0,15	0,003
Fonolito - Mineração Curimbaba	53,7	21,4	3,3	0,22	1,3	7,1	8,37	0,07	0,05	0,22	<0.002
Granodiorito	68,4	13,9	4,6	1,32	2,8	2,5	4,08	0,26	0,05	0,08	<0.002
MBR8	47,5	9,3	5,3	5,35	7,3	1,3	1,76	0,23	10,75	0,13	0,007
Xisto retornado	52,0	11,5	7,5	1,68	2,2	1,2	2,53	0,22	3,30	0,03	0,007

**Tabela 2** – Composição dos agrominerais quanto aos teores de micronutrientes e elementos traço

Agromineral/Remineralizador	Teores de micronutrientes e elementos traço (ppm)									
	Co	Cu	Mo	Zn	Se	As	Cd	Hg	Ni	Pb
Basalto	39,8	33,0	0,4	54,0	<0,5	<0,5	<0,1	<0,01	21,1	0,9
Carbonatito Três Estradas	13,6	9,9	0,5	24,0	3,2	<0,5	0,2	<0,01	14,7	12,9
Dacito Itaara	8,4	21,8	1,1	50,0	0,9	2,5	0,2	<0,01	2,4	4,2
Finos de xisto	14,1	39,9	6,9	102,0	2,0	25,8	0,7	0,43	13,9	17,5
Fonolito - Mineração Curimbaba	0,6	1,4	2,6	131,0	0,6	4,1	0,3	<0,01	1,1	24,7
Granodiorito	8,0	7,9	0,2	64,0	<0,5	<0,5	<0,1	<0,01	4,4	5,5
MBR8	23,6	58,9	10,1	77,0	1,1	29,8	0,5	0,40	16,5	34,0
Xisto retornado	21,2	53,7	9,1	85,0	2,4	29,3	0,4	0,21	22,0	23,8

O meio de cultura utilizado como testemunha e como base para a inserção das matérias-primas em avaliação foi o meio Mínimo (PONTECORVO et al., 1953), constituído por: 6g NaNO<sub>3</sub>, 1,52g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,52g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,52g KCl, 0,01g FeSO<sub>4</sub>, 0,01g ZnCl<sub>2</sub>, 10g glicose, 15g Agar e 1000 mL água destilada.

Diferentemente dos demais agrominerais e fontes orgânicas, a matéria-prima xisto retornado possui pH ácido (4,0) que interfere na solidificação de meios de cultura contendo ágar. Antes da autoclavagem ajustou-se o pH para 6 com NaOH 1 N. Todas as demais fontes orgânicas ou inorgânicas foram empregadas com o pH original, variável de 6,0 a 9,0. As fontes orgânicas e os agrominerais foram inseridos na concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> de meio e, posteriormente, autoclavados a 121°C pelo período de 20 minutos.

Disco de cinco milímetros de diâmetro de cada cultura fúngica foi repicado para o centro de placas de Petri contendo o meio mínimo solidificado agregado dos agrominerais ou fontes orgânicas (10 mL/placa). As placas foram vedadas com Parafilm® e incubadas em BOD, a 25°C, no escuro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 11 x 5, com três repetições, sendo os fatores representados a) adição de diferentes fontes orgânicas e inorgânicas ao meio de cultura (com 11 níveis: Testemunha-meio mínimo puro; Lodo de água; Composto Ecocitrus; Basalto; Carbonatito Três Estradas; Dacito Itaara; Finos de Xisto; Fonolito-mineração Curimbaba; Granodiorito; MBR8; Xisto Retornado) e b) isolados de *Trichoderma spp.* (com cinco níveis: CPACT103; CPACT 124; CPACT 450; CPACT 630; CPACT 647).

As avaliações da interferência no crescimento micelial foram realizadas por meio de medições diárias do diâmetro das colônias fúngicas, com auxílio de régua milimetrada, em dois eixos ortogonais, iniciadas após 24 horas de incubação, e perduraram por quatro dias, momento em que ocorreu a colonização total da superfície do meio de cultivo no tratamento testemunha.

Após 15 dias de incubação procedeu-se à estimativa da concentração de esporos fúngicos. Três discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram retirados de cada repetição e transferidos para frasco do tipo penicilina, contendo 9 mL de água estéril. Após homogeneização do conteúdo em agitador tipo vortex, alíquota de 20 µL foi imediatamente retirada, com auxílio de uma micropipeta, e transferida para câmara de Neubauer, a fim de proceder à contagem do número de esporos em microscópio ótico no aumento de 400X. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de crescimento micelial radial dos cinco isolados de *Trichoderma* spp. estão expressas na Tabela 3. Verificou-se crescimento micelial diferenciado dos isolados fúngicos em presença das fontes orgânicas e dos agrominerais avaliados. Muito embora o composto Ecocitrus e o lodo de água sejam compostos por matéria orgânica, o composto Ecocitrus apresentou crescimento comparável ao do tratamento testemunha independentemente do isolado, porém o Lodo de água proporcionou um retardo no crescimento do isolado CPACT450 na ordem de 37%.

Os agrominerais xisto retornado e finos de xisto apresentam carbono orgânico em sua constituição, muito embora resultados significativamente inferiores, da ordem de 32% e 36%, foram obtidos para os isolados CPACT 450 e CPACT 647 na presença de xisto retornado, respectivamente, em relação ao tratamento testemunha e composto Ecocitrus (Tabela 3). Percebe-se que o fino de xisto apresenta carbono mais lábil e, portanto, mais facilmente utilizável pelos micro-organismos (estruturas alifáticas), enquanto o xisto retornado tem maior proporção de estruturas aromáticas, o que poderia explicar, ao menos parcialmente, o desempenho inferior do xisto retornado frente aos dois isolados.

Todos os demais agrominerais avaliados resultaram em crescimento inferior à testemunha no quarto dia de avaliação, à exceção dos agrominerais MBR8, Granodiorito, Dacito Itaara e Carbonatito Três Estradas (CPACT 124) e MBR8 e Fonolito Curimbaba (CPACT 630). Embora tenha-se detectado retardo no crescimento micelial para os demais isolados fúngicos avaliados, todos apresentaram crescimento igualável ao do tratamento testemunha ao final de sete dias de incubação.

Nota-se que o CPACT 124 e o CPACT 630 apresentaram comportamento satisfatório na maioria das fontes em avaliação, diferentemente dos demais isolados, que se mostraram sensíveis até o quarto dia de avaliação frente às diferentes matrizes (Tabela 3).

**Tabela 3** – Efeito in vitro de diferentes agrominerais e fontes orgânicas sobre o crescimento micelial de cinco isolados de *Trichoderma* spp. após quatro dias de incubação.

Fontes orgânicas e inorgânicas	Diâmetro médio da colônia (cm)				
	Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. (CPACT)				
	103	124	450	630	647
Basalto	6,98 bc A	3,37 b C	3,27 cd C	5,10 c B	3,92 ef C
Carbonatito Três Estradas	6,40 cd B	8,00 a A	2,55 d D	3,98 d C	3,78 f C
Composto Ecocitrus	8,00 a A	8,00 a A	8,00 a A	8,00 a A	7,62 a A
Dacito Itaara	7,23 abc B	8,00 a A	3,88 c D	8,00 a A	4,73 cde C
Finos de xisto	8,00 a A	8,00 a A	8,00 a A	8,00 a A	8 a A
Fonolito Curimbaba	5,90 d B	4,02 b C	3,42 cd C	7,48 a A	3,78 f C
Granodiorito	6,50 cd B	8,00 a A	3,27 cd D	6,30 b B	4,22 def C
Lodo de água	7,42 ab AB	8,00 a A	5,00 b C	8,00 a A	6,7 b B
MBR8	6,80 bc B	8,00 a A	3,78 c D	8,00 a A	5,05 cd C
Testemunha	8,00 a A	8,00 a A	8,00 a A	8,00 a A	8 a A
Xisto retornado	8,00 a A	8,00 a A	5,45 b B	8,00 a A	5,13 c B

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

A esporulação média dos cinco isolados de *Trichoderma spp.* estão apresentadas na Tabela 4. Verificou-se a existência de comportamento diferencial conforme os isolados avaliados frente aos diferentes agrominerais. A grande maioria dos agrominerais proporcionou desempenho superior em relação ao tratamento testemunha, com destaque para Carbonatito Três Estradas (CPACT 124), MBR8 (CPACT 103), xisto retornado (CPACT 124), granodiorito (CPACT 103), com incremento da ordem de 735%, 291%, 202% e 178%, respectivamente. Fonolito Curimbaba reduziu significativamente a esporulação do isolado CPACT 103 na ordem de 81%. Possivelmente o comportamento do Fonolito se deve aos teores elevados de sódio (Tabela 1). Soma-se a isto o fato de existir a possibilidade de estar-se avaliando diferentes espécies de *Trichoderma*, sendo esta premissa atribuída ao comportamento diferenciado dos referidos isolados em presença das matérias-primas (Tabela 4).

**Tabela 4** – Efeito *in vitro* de diferentes agrominerais e fontes orgânicas sobre a esporulação de cinco isolados de *Trichoderma spp.* após 15 dias de incubação.

Fontes orgânicas e inorgânicas	Esporos (mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )				
	Isolados de <i>Trichoderma spp.</i> (CPACT)				
	103	124	450	630	647
Basalto	19,62 bc A	1,11 b B	1,18 a B	2,27 a B	1,8 cd B
Carbonatito Três Estradas	14,45 cd A	10,65 a A	0,55 a B	1,63 a B	1,12 cd B
Composto Ecocitrus	25,43 b A	8,11 ab BC	7,94 a BC	2,07 a C	10,81 ab B
Dacito Itaara	14,52 cd A	1,97 b B	1,33 a B	1,61 a B	0,59 d B
Finos de xisto	14,66 cd A	2,53 ab BC	7,64 a ABC	0,84 a C	9,04 abc AB
Fonolito Curimbaba	1,74 e A	0,55 b A	1,16 a A	2,56 a A	1,56 cd A
Granodiorito	25,06 b A	2,98 ab B	0,47 a B	2,01 a B	2,08 cd B
Lodo de água	12,36 cd A	0,99 ab B	1,23 a B	0,38 a B	2,03 cd B
MBR8	35,34 a A	2,52 b B	2,07 a B	5,57 a B	2,96 bcd B
Testemunha	9,03 de A	1,27 b B	3,56 a AB	6,37 a AB	4,74 bcd AB
Xisto retornado	23,97 b A	3,85 ab C	2,45 a C	8,54 a BC	14,1 a B

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

## CONCLUSÕES

Existe comportamento diferenciado em relação ao crescimento micelial e esporulação de isolados de *Trichoderma spp.* frente aos agrominerais e fontes orgânicas avaliadas. Os agrominerais diminuem a velocidade do crescimento micelial inicial, o qual se iguala ao tratamento testemunha aos sete dias de incubação. A maioria dos agrominerais proporciona desempenho superior à testemunha na esporulação dos isolados, com destaque para Carbonatito Três Estradas (CPACT 124), MBR8 (CPACT 103), Xisto Retornado (CPACT 124), Granodiorito (CPACT 103).