

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Trichoderma harzianum*

Gesiane Ribeiro Guimarães¹, Carolina dos Santos Galvão², Sueli Corrêa Marques de Mello³, Daniel Diego Costa Carvalho⁴

¹ Tecnóloga em Gestão Ambiental, mestre em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri, Goiás.

² Engenheira agrônoma, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri, Goiás.

³ Doutora em Fitopatologia, Pesquisadora A, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal.

⁴ Doutor em Fitopatologia, Professor DES V nível 1, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri, Goiás. Email: daniel.carvalho@ueg.br

RESUMO: Variações morfológicas ou genéticas entre isolados de *Trichoderma harzianum* tem sido recentemente pesquisadas em muitos trabalhos, pois *T. harzianum* é considerado um agregado de espécies, agrupadas com base em padrões de ramificação de conidióforos e características particulares às fiálides e conídios. O objetivo deste trabalho foi verificar se existem variações micromorfológicas entre cinco isolados de *T. harzianum*, previamente identificados por sequenciamento das regiões ITS-1 e ITS-4 do rDNA. Para obtenção dos dados, parte do micélio desenvolvido a 25°C, em meio BDA e ausência de luz, por sete dias, foi removido para confecção de lâminas semi-permanentes. As fiálides tiveram dimensões de 3,7 – 8,2 x 1,4 – 3,8 µm (5,5 x 2,3 µm), com relação comprimento/largura (C/L) de 2,1 – 2,4, enquanto que os conídios eram subglobosos e ovais com medidas médias de 1,6 – 3,6 x 1,5 – 3,2 µm (2,6 x 2,1 µm) e relação C/L de 1,02 – 1,11. Embora seja um agregado de espécies, não houve variações morfológicas no formato ou nas medidas das estruturas mensuradas. As lâminas foram depositadas no Laminário Fitopatológico da Universidade Estadual de Goiás.

Palavras-chave: Taxonomia de fungos. Algodoeiro. Fungos do solo.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Trichoderma harzianum* ISOLATES

ABSTRACT: Morphological and genetic variations among *Trichoderma harzianum* isolates has been recently researched in several studies, since *T. harzianum* comprises in a specie aggregate, grouped based on conidiophore branching patterns and particular features of phialides and conidia. The objective of this study was to verify if there are a micromorphological variation among five *T. harzianum* isolates, previously identified by sequencing the ITS-1 and ITS-4 rDNA regions. To obtain the data, part of the mycelium grown at 25°C on PDA medium and in the dark, was removed from seven-day-old colonies to prepare semi-permanent microscope slides. The phialides showed 3.7 – 8.2 x 1.4 – 3.8 µm (5.5 x 2.3 µm), with length/width ratio (L/W) of 2.1 – 2.4, while the conidia were subglobose and oval shape with average measure of 1.6 – 3.6 x 1.5 – 3.2 µm (2.6 x 2.1 µm) and

L/W ratio of 1.02 – 1.11. Although an aggregate species, there were not morphological variations in the shape or average of the measured structures. The semi-permanent slides were stored in the Goiás State University Plant Disease Slide Collection.

Key words: Fungi taxonomy. Cotton plant. Soil

fungi.

INTRODUÇÃO

Um dos componentes iniciais relativos a experimentos com o fungo *Trichoderma* compreendem a sua identificação, seja por meio de sequenciamento de DNA ou baseada em caracteres morfológicos (CHAVERRI *et al.*, 2003; ABD-ELSALAM *et al.*, 2010; KAMALA *et al.*, 2015). Especificamente, os marcadores de DNA tornaram-se uma ferramenta poderosa para o estudo de taxonomia e análise molecular de organismos (LÓPEZ-MONDÉJAR *et al.*, 2011). Embora a caracterização molecular seja uma fonte imensa de dados que pode auxiliar os cientistas na identificação de espécies de *Trichoderma* (GAJERA; VAKHARIA, 2010), a taxonomia de espécies deste gênero tem sido definida com base nas suas características morfológicas, principalmente o tamanho e forma de conídios e fiáldes (SAMUELS *et al.*, 2009; MUTHUKUMAR *et al.*, 2011).

As características morfológicas de colônias, bem como a velocidade de crescimento micelial a diferentes temperaturas foram utilizadas por PARK *et al.* (2005b). Para caracterização de isolados, entretanto, diferenças entre sete diferentes espécies (*Trichoderma* sp.1, *Trichoderma* sp.2, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride* e *T. longibrachiatum*) foram evidenciadas mediante mensuração de caracteres micromorfológicos.

Variações morfológicas ou genéticas entre isolados de *T. harzianum* continuam sendo estudadas por vários autores (PARK *et al.*, 2005a, b; SHARMA *et al.*, 2009; ABD-ELSALAM *et al.*, 2010; KAMALA *et al.*, 2015). Segundo GRONDONA *et al.* (1997), a espécie *T. harzianum* pode ser dividida em três, quatro ou até cinco subgrupos específicos, dependendo das estirpes e características avaliadas. Deste modo, variações morfológicas entre isolados de uma mesma espécie de *Trichoderma* podem ocorrer, visto que as características morfológicas são facilmente alteradas por influências ambientais (PARK *et al.*, 2005b).

Recentemente, o potencial de cinco isolados de *T. harzianum* como agentes de controle biológico de patógenos habitantes do solo foi observado em laboratório e em campo por GUIMARÃES *et al.* (2014), CARVALHO *et al.* (2014) e CARVALHO *et al.* (2015). Entretanto, pouco se conhece sobre as variações morfológicas entre estes isolados. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização micromorfológica de cinco isolados de *T. harzianum*, previamente identificados por sequenciamento das regiões ITS-1 e ITS- 4 do rDNA, para verificar se existem variações morfológicas entre estes isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco isolados de *T. harzinaum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) utilizados neste trabalho pertencem a Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil. Os ensaios foram realizados na Universidade Estadual de Goiás (UEG), Ipameri, Goiás, Brasil. As culturas armazenadas em nitrogênio líquido foram recuperadas em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA; batata 200 g L⁻¹, dextrose 20 g L⁻¹, e ágar 20 g L⁻¹ a pH 6,5).

Para obtenção dos dados micromorfológicos, parte do micélio de colônias desenvolvido a 25°C em meio BDA e ausência de luz, após sete dias de incubação, foi removido para confecção de lâminas semi-permanentes. Estas foram preparadas empregando-se o corante azul de algodão como meio de montagem. Imagens das estruturas micromorfológicas foram capturadas com a utilização do microscópio LEICA DM500 e as medições das estruturas (40 medições para cada estrutura) foram feitas pelo uso do software LAS EZ. 2.0 (100x). As lâminas foram depositadas no Laminário Fitopatológico, da Universidade Estadual de Goiás.

Os dados relativos às medidas das estruturas fúngicas foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011), para obtenção do coeficiente de variação para o comprimento e largura dos conídios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características micromorfológicas dos cinco isolados de *T. harzianum* são descritos na Tabela 1. As fiálides mostraram dimensões de 3,7 – 8,2 x 1,4 – 3,8 µm (5,5 x 2,3 µm), com relação comprimento/largura (C/L) de 2,1 – 2,4. Estas medidas estão em conformidade com Park *et al.* (2005b) que, trabalhando com um isolado-tipo de *T. harzianum* ocorrente em substrato para cultivo de cogumelos, encontraram medidas muito próximas: 3,5 – 7,6 x 1,8 – 3,4 µm (5,4 x 2,6 µm) e relação C/L de 2,1. Os valores publicados por Samuels *et al.* (2009): 6,5 – 6,7 x 1,6 – 4,5 µm (C/L de 2,1 - 2,2), são menos variáveis, porém também dentro dos intervalos verificados no presente trabalho.

Tabela 1. Características micromorfológicas de isolados de *Trichoderma harzianum* (CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316)^(a)

Isolados	Fiálides		Conídios	
	Tamanho (µm)	C/L ^(b)	Tamanho (µm)	C/L ^(b)
CEN287	3,8 – 7,2 x 1,4 – 3,2 (5,3 x 2,3)	2,4	1,8 – 3,2 x 1,8 – 2,7 (2,4 x 2,1)	1,10
CEN288	3,8 – 8,2 x 1,6 – 2,8 (5,3 x 2,3)	2,3	2,0 – 3,6 x 1,8 – 3,0 (2,5 x 2,3)	1,11
CEN289	4,0 – 6,9 x 1,6 – 3,3 (5,5 x 2,4)	2,3	1,6 – 3,2 x 1,5 – 3,2 (2,4 x 2,2)	1,08
CEN290	4,2 – 6,6 x 1,8 – 3,0 (5,5 x 2,5)	2,2	2,0 – 2,8 x 1,7 – 3,0 (2,4 x 2,3)	1,02
CEN316	3,7 – 7,0 x 2,0 – 3,8 (5,5 x 2,6)	2,1	2,0 – 2,9 x 2,0 – 2,8 (2,6 x 2,4)	1,06

^(a)Valores médios obtidos a partir de 40 unidades de cada característica.

^(b)Relação entre o comprimento e a largura.

Os cinco isolados de *T. harzianum* apresentaram conídios subglobosos e ovais com medidas médias de 1,6 – 3,6 x 1,5 – 3,2 µm (2,6 x 2,1 µm) e relação C/L de 1,02 – 1,11. De forma análoga, estes valores seguem muito fiéis aos encontrados por Park *et al.* (2005b): 1,8 – 3,3 x 1,7 – 3,2 µm (2,5 x 2,3 µm) (C/L de 1,13) e por Samuels *et al.* (2009): 2,0 – 5,0 x 1,8 – 4,0 µm (C/L de 1,1 – 1,2).

A análise de sequência das regiões ITS1 e 2 do rDNA tem sido particularmente viável para a caracterização do gênero *Trichoderma* ao nível de espécie (SAMUELS *et al.*, 2002). Neste sentido, após identificação molecular dos isolados CEN, atenção foi dada, no presente trabalho, para a caracterização destes, com vistas a verificar variações morfológicas entre os isolados.

De acordo com Shalin *et al.* (2006), *T. harzianum* é um agregado de espécies, agrupadas com base em padrões de ramificação de conidióforos (ramificações laterais curtas) e fiálides curtas e infladas. Embora seja um agregado de espécies, não foram vistas variações morfológicas nas medidas das estruturas mensuradas dos isolados CEN (Tabela 1). Uma explicação para isso reside no fato de estes isolados pertencerem a um único bioma (Cerrado) e provenientes do solo de uma mesma localidade (solo de cultivo de algodão, Planaltina, DF, Fazenda Cooperbrás, Núcleo Rural do Rio Preto).

Para Sharma *et al.* (2009), é possível que as variantes de *T. harzianum* surjam a partir de recombinantes durante a reprodução sexual do fungo. No entanto, uma diversidade genética entre isolados seria possível de obter se fossem analisadas populações de diferentes localidades de uma grande região, ou mesmo de um país, indicando que a migração e reprodução sexual desempenham papel importante na dinâmica populacional de *T. harzianum* (CHAVERRI *et al.*, 2003).

Os isolados de *T. harzianum* apresentaram coeficientes de variação relativamente elevados para o comprimento (CEN287: 12,70%; CEN288: 14,93%; CEN289: 15,99%; CEN290: 9,31% e CEN316: 9,60%) e largura (CEN287: 10,89%; CEN288: 14,14%; CEN289: 17,44%; CEN290: 10,69% e CEN316: 8,26%) dos conídios. Em outro fungo *Hyphomycetes*, Guimarães e Carvalho (2014), encontraram coeficientes de variação menores para conídios de *Cladosporium herbarum* (9,23 e 3,72% para o comprimento e largura, respectivamente). Embora tenha sido verificado coeficiente de variação de até 17,44% na largura dos conídios de um isolado de *T. harzianum*, não houve diferença entre os isolados, uma vez que os valores médios para comprimento e largura de conídios e fiálides não foram significativos.

CONCLUSÃO

Não há variações morfológicas no formato e nas medidas das estruturas (fiálides e conídios) mensuradas nos isolados de *T. harzianum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio oferecido pelo Programa de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por uma bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, K. A.; ALMOHIMEED, I.; MOSLEM, M. A.; BAHKALI, A. H. M13-microsatellite PCR and rDNA sequence markers for identification of *Trichoderma* (Hypocreaceae) species in Saudi Arabian soil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p.2016-2024, 2010.

CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, New York, v. 39, n. 5, p.384-391, 2014.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; MARTINS, I.; LOBO JUNIOR, M. Biological control of Fusarium wilt on common beans by in-furrow application of *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, New York, v. 40, n. 6, p.375-381, 2015.

CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L. A.; OVERTON, B. E.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, n. 6, p.1100-1140, 2003.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p.1039-1042, 2011.

GAJERA, H. P.; VAKHARIA, D. N. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* van Tieghem. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 3, p.274-282, 2010.

GRONDONA, I.; HERMOSA, M. R.; TEJADA, M.; GOMIS, M. D.; MATEOS, P. F.; BRIDGE, P.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 8, p. 3189-3198, 1997.

GUIMARÃES, G. R.; CARVALHO, D. D. C. Incidência e caracterização morfológica de *Cladosporium herbarum* em feijão comum cv. 'Pérola'. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 12, n. 3, p.137-140, 2014.

GUIMARÃES, G. R.; PEREIRA, F. S.; MATOS, F. S.; MELLO, S. C. M.; CARVALHO, D. D. C. Suppression of seed borne *Cladosporium herbarum* on common bean seed by *Trichoderma harzianum* and promotion of seedling development. **Tropical Plant Pathology**, New York, v. 39, n. 5, p.401-406, 2014.

Cultura Agronômica, Ilha Solteira, v.25, n.2, p.131-136, 2016

KAMALA, T. H.; DEVI, S. I.; SHARMA, K. C.; KENNEDY, K. Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p.1-21, 2015.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ROS, M.; PASCUAL, J. A. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. **Biological Control**, San Diego, v. 56, n. 1, p.59-66, 2011.

MUTHUKUMAR, A.; ESWARAN, A.; SANJEEVKUMAS, K. Exploitation of *Trichoderma* species on the growth of *Pythium aphanidermatum* in chili. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 4, p.1598-1607, 2011.

PARK, M. S.; SEO, G. S.; BAE, K. S.; YU, S. H. Characterization of *Trichoderma* spp. associated with green mold of oyster mushroom by PCR-RFLP and sequence analysis of ITS regions of rDNA. **The Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 21, n. 3, p.229-236, 2005. (a)

PARK, M. S.; SEO, G. S.; LEE, K. H.; BAE, K. S.; YU, S. H. Morphological and cultural characteristics of *Trichoderma* spp. associated with green mold of oyster mushroom in Korea. **The Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 21, n. 3, p.221-228, 2005. (b)

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; McCRAY, E. B. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA**. Disponível em <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> . Acesso em: 02 fev. 2009.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURRY, L. A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, Lawrence, v. 94, n. 1, p.146-170, 2002.

SHALIN, S.; NARAYAN, K. P.; LATA.; KOTASTHANE, A. S. Genetic relatedness among *Trichoderma* isolates inhibiting a pathogenic fungi *Rhizoctonia solani*. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 5, n. 8, p.580-584, 2006.

SHARMA, K.; MISHRA, A. K.; MISRA, R. S. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 157, n. 1, p.51-56, 2009.