

VARIABILIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Trichoderma harzianum*. I - ASPECTOS CITOLÓGICOS

E. PERES; I.S. DE MELO

CNPMA/EMBRAPA, C.P. 69, CEP: 13820-000 - Jaguariúna, SP

RESUMO: Objetivou-se neste trabalho estudar a variabilidade de isolados selvagens de *Trichoderma harzianum* baseado nas características culturais e citológicas. Observaram-se o tamanho dos fialosporos, número de núcleos por fialosporos e crescimento e esporulação em meio de malte-ágar. Pelos resultados aqui encontrados foi possível reconhecer que há variação entre os isolados selvagens da espécie *T. harzianum*. Com relação ao número de núcleos, verificou-se uma variação de 1 a 3 núcleos por fialosporos. Também observou-se padrões diferenciais de crescimento e morfologia da colônia. Mais de 50% dos isolados atingiram o máximo de crescimento em 48 horas.

Descritores: *Trichoderma harzianum*, citologia, variabilidade

VARIABILITY AMONG *Trichoderma harzianum* ISOLATES. I - CYTOLOGICAL ASPECTS

ABSTRACT: This study is based largely on morphological and cultural characters of *Trichoderma harzianum* isolates. It were observed the size of phialospores, mycelial growth and sporulation on malt extract agar and nuclei number per phialospores, stained with Giemsa. A x 100 oil immersion len was used in examining and in measuring phialospores. Based on the size of phialospores, it was possible recognize that there is variaton among the wild isolates for the specie *T. harzianum*. Also, with relation to mycelial growth and sporulation can itself distinguish from one another different pattern. Up to 50% of isolates had maximum growth in 48 hours. The nuclei number of 1 to 3 per phialospore was observed.

Key Words: *Trichoderma harzianum*, citology, variability

INTRODUÇÃO

Trichoderma spp. é um fungo saprófita componente ativo da microflora do solo.

Como agente de biocontrole, pode proteger plantas contra patógenos de solo (COOK & DAKER, 1983; PAPAVIDAS, 1985; CHET & ELAD, 1983; MELO, 1991) e promover crescimento de plantas (WINDHAM *et al.*), através de um fator que regula o crescimento e germinação de sementes. O gênero tem sido estudado extensivamente como fonte potencial de celulasas (MANDELS, 1975; SUM & BROWN, 1976; STERNBERG, 1976). GHOSE & GROSH (1979) sugerem que o sistema enzimático mais promissor para o processo de sacarificação da celulose cristalina é o de *Trichoderma*.

A taxonomia, a genética e composição da população de *Trichoderma* spp. não são ainda bem compreendidas e, portanto, são necessários métodos mais precisos para diferenciar linhagens

de diferentes espécies para propósito de patente ou determinação da variabilidade de linhagens em ecossistemas naturais.

Isolados de *T. harzianum* têm diferido na sua capacidade de atacar certos fungos fitopatogênicos, tais como: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium aphanidermatum* (ELAD *et al.*, 1982).

O presente trabalho relata a variabilidade natural de isolados selvagens de *T. harzianum* quanto ao tamanho dos fialosporos, número de núcleos por fialosporos e taxa de crescimento e esporulação em meio de cultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Isolados de *T. harzianum*

Os isolados th.1, th.2, th.3, th.4, th.5, th.6, th.7, th.8 e th.9, foram provenientes do CNPAF/EMBRAPA em Goiânia, GO e os isolados

Tal-1, Tal-8 e Tma-4, do solo do Estado de São Paulo e o Th-95 foi isolado na Colômbia e tem sido estudado extensivamente nos Estados Unidos como antagonista ao fungo *Rhizoctonia solani*, cedido por Dr. R. Baker (Colorado University, USA).

2. Crescimento Micelial e Conidiação

A variabilidade no crescimento apresentada pelos isolados foi verificada através da medida do diâmetro das colônias, crescidas em meio de BDA (batata, dextrose e ágar), com 24 e 48 h após inoculação de um disco de meio BDA contendo conídios jovens no centro de cada placa de Petri. As culturas foram incubadas a 30°C no escuro.

Para determinar a quantidade de conídios produzidos pelos isolados, 3 discos de 1 cm de diâmetro foram retirados de cada colônia no 5º dia de crescimento e colocados em 3 ml de solução de Tween 80 a 0,1% para desagregação dos mesmos através da agitação. A contagem direta dos conídios foi efetuada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico.

3. Coloração de Núcleos de Conídios

Os isolados de *T. harzianum* foram incubados por 72 horas, em meio de Aveia-Ágar, a 30°C. Os conídios formados foram aderidos à lamínulas contendo albumina a 50% e fixados durante 30 minutos em etanol: ácido acético (3:1). A seguir os conídios aderidos foram fixados durante 5 min. em álcool 95% e depois 20 min. em álcool 70%. O material foi lavado 3 vezes em água destilada e hidrolizado em HCl 1 N à 60°C durante 7 min. Lavou-se por mais 3 vezes consecutivas em água destilada e uma vez em solução tampão fosfato pH 6.9. O material foi corado com 1 ml de solução de Giemsa e 9 ml de tampão fosfato pH 6.9 por 30 min.

O diâmetro dos conídios foi estimado com auxílio de ocular micrométrica Carl Zeiss 4892628 (8x) em objetiva de 100x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento e Esporulação

Trichoderma é um fungo de crescimento rápido. Daí a grande vantagem de utilização como agente de biocontrole em larga escala. A

TABELA 1 mostra que, dos 12 isolados, 7 atingiram o crescimento máximo em 48 horas. Há, portanto, uma variação na taxa de crescimento entre os isolados, principalmente, nas primeiras 24 horas de crescimento a 30°C. O isolado Th-95, usado com sucesso no biocontrole, tem um crescimento mais lento comparado aos demais isolados, assim como apresenta uma taxa mais baixa de esporulação. Nem todos os isolados que apresentaram crescimento mais rápido correspondem àqueles com maior esporulação, mesmo Th-2, Th-3, Th-4 e Th-8 que apresentam esporulação na periferia da placa.

Os isolados Th-2, Th-8, Th-95 e Tma-4 quando crescidos em BDA descolorem o meio com a produção de substâncias metabólicas de coloração que varia de amarelo claro ao marrom.

TABELA 1 - Variação no crescimento micelial e esporulação em isolados selvagens de *T. harzianum*.

ISOLADOS	Crescim. Micelial (cm)		Esporulação ¹ (x 107 esporos)
	24 horas	48 horas	
Th.1	6,39	9,00	8,294
Th.2	4,12	9,00	1,485
Th.3	8,01	9,00	1,076
Th.4	6,67	9,00	0,610
Th.5	3,83	9,00	7,563
Th.6	2,89	7,27	6,857
Th.7	2,89	9,00	2,544
Th.8	5,23	9,00	1,261
Th.95	2,37	6,48	0,171
Tal.1	2,59	7,14	8,369
Tal.8	2,62	6,79	1,407
Tma.4	2,17	7,53	0,567

¹Esporulação após 48 horas. Média de 4 repetições

Tamanho de Conídios

Os esporos de *T. harzianum* são ovóides ou globosos. Verifica-se que o tamanho dos mesmos varia em diferentes isolados (TABELA 2), de 2,53 um a 4,23 um, apesar de muitos destes serem provenientes do solo da mesma região, como é o caso dos isolados Th.1, Th.2, Th.3, Th.4, Th.5, Th.6, Th.7 e Th.8. De acordo com a

taxonomia de espécies de *Trichoderma*, RIFAI (1969) descreve que os esporos de *T. harzianum* variam de 2,4 - 3,2 um x 2,2 - 2,8 um, com uma média em torno de 3,0 x 2,7 um. Descrições feitas para isolados do solo em Sheffield, Inglaterra.

O isolado Th.1, com comprimento médio de 4,23 e largura de 3,72 um pode ser uma outra espécie de *Trichoderma*, pois não se inclui na chave de taxonomia do Gênero, feita por Rifai. As espécies *T. longibrachiatum* e *T. pseudokoningii*, apresentam esporos maiores, com 3,6 - 6,5 x 2,2 x 30 um e 3,4 - 4,6 x 2,0 - 5,0 um, respectivamente (RIFAI, 1969).

Estudos mais aprofundados sobre características morfológicas de outras estruturas do fungo precisam ser feitos; assim como a utilização de técnicas modernas de biologia molecular, como polimorfismo de DNA de diferentes linhagens de diferentes espécies, no sentido de elucidar e distinguir com certa segurança espécies de gênero *Trichoderma*.

TABELA 2- Variação no comprimento e largura de conídios em isolados selvagens de *T. harzianum*.

ISOLADOS	Compr. de Conídios (um)			Largura de Conídios (um)		
	X	S	C.V.	X	S	C.V.
Th.1	4,2316	0,6430	15,1965	3,7205	0,5621	18,1080
Th.2	2,6671	0,4389	16,4561	2,3766	0,3297	13,8733
Th.3	3,1573	0,5783	18,3167	2,5911	0,4421	17,0643
Th.4	3,9932	0,6486	16,2429	2,9502	0,4090	13,8639
Th.5	2,8593	0,4892	17,1108	2,4912	0,4586	18,4113
Th.6	3,4121	0,5098	14,9413	2,8459	0,3726	13,0916
Th.7	2,9204	0,5366	18,3742	2,6000	0,4794	18,4372
Th.8	2,5330	0,4925	17,7360	2,3319	0,3767	16,1541
Th.95	2,8608	0,5575	19,4878	2,4883	0,5211	20,9430
Tal.1	3,4196	0,4882	14,2763	3,0232	0,2481	8,2081
Tal.8	3,6669	0,5506	15,0150	2,9696	0,1775	5,9776
Tma.4	2,7330	0,4573	16,7338	2,7327	0,4571	16,7252

Número de Núcleos por Conídio

Houve diferenças entre os isolados estudados quanto ao número de núcleos em cada conídio da espécie *T. harzianum*. Em geral, todos os isolados mostraram maior proporção de conídios uninucleados, apesar de 8 isolados (Th.1, Th.3, Th.4, Th.5, Th-95, Tal.11, Tal.8 e Tma.4) apresentarem conídios com dois núcleos e, destes, os

isolados Th.3, Th.5, Th.95, Tal.11 e Tal.8, com três núcleos (TABELA 3). O número médio básico de núcleos deve ser usado para estudo taxonômico, que deve ser incrementado nesta espécie, além de outros parâmetros como variação isoenzimática, cujos resultados serão publicados posteriormente.

A coloração com Giemsa permitiu uma boa visualização dos núcleos. O pequeno tamanho destes não permitiu a mensuração dos mesmos. Sobre estes aspectos não se dispõe de dados na literatura para comparar tais resultados. Em *T. pseudokoningii*, FURLANETO (1989) tem mostrado que esta espécie apresenta esporos uninucleados. Segundo NEVALAINEN (1985) os conídios de *T. reesei* são haplóides e uninucleados, como também estes estudos têm revelado a presença de no mínimo quatro cromossomos grandes.

Linhagens que apresentam elevado número de núcleos por célula mostram desvantagens em relação àquelas com poucos núcleos quanto a alta variabilidade que apresentam, assim como a grande dificuldade de obter mutantes estáveis. No presente estudo, verifica-se que a espécie *T. harzianum* é primordialmente, uninucleada.

TABELA 3 - Variação no número de núcleos por conídios em isolados selvagens de *T. harzianum*.

ISOLADOS	% de Conídios		
	uninucleados	binucleados	trinucleados
Th.1	96	4	-
Th.2	100	-	-
Th.3	81	16	3
Th.4	99	1	-
Th.5	63	21	16
Th.6	100	-	-
Th.7	100	-	-
Th.8	100	-	-
Th.95	43	24	33
Tal.1	72	17	11
Tal.8	60	30	10
Tma.4	87	13	-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. *Les Colloques of L'INRA, Paris*, v.18, n. 35-40, 1983.

- COOK, R.J.; BAKER, K.P. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: American Phytopathological Societs, 1983. p.539.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiologis**, Ottawa, v.28, p.719-725, 1982.
- FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celuloses em trichoderma pseudokoningii var. RIFAI. Piracicaba, 1989. 152p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GHOSE, T.K.; GHOSH, P. Cellulose production and cellulose hydrolysis. *Process Biochemistry*, London, v.1, p.14, 1979.
- MANDELS, M. Microbiol sources of cellulases. In: WIKÉ C.R. (Ed.) **Cellulose as a chemical and energy resource**. New York: John Wiley, 1975. p.81-105.
- MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1991, p.388.
- NEVAILANEN, H. Genetic improvement of enzyme production in industrially important fungal strains. Helsinki, 1985. 243p. Thesis (PhD) - University of Helsinki).
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and Gliocládium: biology ecology, andd potencial por biological control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.23, p.23-54, 1985.
- RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, Wallingford, v.116, p.1-56, 1969.
- STERNBERG, D.B. Glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role is sacharification of cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.31, p.648-654, 1976. o7 3
- SUM, E.K.; BROWN, R.D. Strutral characterization of a glucoprotein cellulose. 1,4 =b =d =glucam cellobiodydrolase C from *Trichoderma viride*. **Biochimica et Biophysica**, Amsterdam, v.446, p.371-386, 1976.
- WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R.A. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.76, p.518-521, 1986.

Entregue para publicação em 16.06.93
 Accito para publicação em 10.01.95