

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E CULTURAL DE *TRICHODERMA* SPP. EM SOLOS CULTIVADOS MAJORITARIAMENTE COM O FEJJOEIRO COMUM

LIDIANNE LEMES DA SILVA¹, ALAERSON MAIA GERALDINE², ELDER TADEU BARBOSA³, RENATA SILVA BRANDÃO⁴, MURILLO LOBO JUNIOR⁵

INTRODUÇÃO: O controle biológico é um método natural empregado no manejo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo, como as podridões radiculares (*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*) e o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), por sua vez responsáveis por perdas severas em culturas de importância econômica em todo o mundo como o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (LOBO JUNIOR, et al., 2009). O uso de fungos e bactérias antagonistas formulados tem aumentando nos últimos anos, especialmente por atuar onde outros métodos não são eficientes, como na redução do potencial de inóculo dos patógenos do solo (POSSE et al., 2010). Diante disso, fitopatologistas e empresas têm mostrado considerável interesse na aplicação de microrganismos como agentes biológicos, em processos que vão desde a prospecção de antagonistas eficientes até a validação de resultados em campo, em experimentos específicos de controle biológico. Entre os vários organismos estudados, as espécies do gênero *Trichoderma* têm recebido atenção científica e agroeconômica por apresentarem ações de antagonismo tais como parasitismo, antibiose e competição (SANTOS et al., 2007). Para atender a demanda de desenvolvimento de programas de controle biológico, a formação de coleções de culturas microbianas é fundamental por ser a primeira etapa do processo de seleção de antagonistas, ao abranger um estoque representativo de amostras de isolados e oportunidade de gerar informações economicamente que levem ao uso em maior escala desses microrganismos (MELLO, 2008). O objetivo desse trabalho foi estabelecer uma coleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de patógenos habitantes do solo que afetam a produção do feijoeiro comum, e identificar em nível de espécie morfológica os isolados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS: Amostras do solo foram coletadas da camada de 0-10 cm, majoritariamente em lavouras de feijão comum, em diferentes locais do país. Em laboratório na Embrapa Arroz e Feijão, estas amostras foram encaminhadas para isolamento de *Trichoderma* spp. com o uso de meios de cultura semi-seletivos de Martim (MM) (18 g de Agar, 10 g de dextrose + 0,5 g de sulfato de magnésio + 0,5 g de peptona + 0,5 g extrato de carne + 0,05 g rosa de bengala + 1000 mL de água destilada + 0,3 g de cloranfenicol); e meio batata-dextrose-ágar (19g BDA Acumedia + 0,25 mL Triton X100 + 0,3 g cloranfenicol + 1000 mL de água destilada), previamente autoclavados a 120 °C e 1 atm por 20 minutos. A partir de cada amostra, 10g de solo foram colocados em erlenmeyer de 250 mL com 90 g de água destilada e esterilizada, posteriormente agitados a 170 rpm por 40 minutos. Em seguida, a suspensão de solo foi submetida a diluição em série até 10⁻³ agitando-se os tubos de ensaio em vortex até suspensão completa das partículas. Então, realizou-se o plaqueamento profundo, pipetando-se 1 mL seguido da adição de cerca de 20 mL do meio MM ou meio BDA + Triton X100. A suspensão de solo diluída foi misturada homoganeamente ao meio de cultura por meio de movimentos circulares. As placas contendo meio solidificado foram incubadas sob 25 °C no escuro durante cinco dias. Posteriormente, iniciou-se a identificação das colônias de *Trichoderma* spp. nas placas de MM e BDA + Triton X100. As colônias identificadas como *Trichoderma* spp. apresentaram micélio inicialmente de cor branca, que se torna posteriormente verde devido à produção abundante de conídios (Figura 1). A identificação em nível de espécie morfológica foi feita considerando aspectos macroscópicos e microscópicos. Para a análise macroscópica os isolados foram transferidos para

¹ Engenheira Agrônoma, Bolsista DTI/CNPq, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: lidiannelemes@hotmail.com

² Engenheiro Agrônomo, mestrando do PPGA/UFG, Goiânia, GO. E-mail: alaersonmaia@hotmail.com

³ Farmacêutico, Assistente A, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: elder@cnpaf.embrapa.br

⁴ Bióloga, mestranda em Biologia, UFG, Goiânia, GO. E-mail: brandaobio@hotmail.com

⁵ Engenheiro Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: murillo@cnpaf.embrapa.br

placas de Petri de 90 mm com BDA, incubadas sob 30 e 35 °C por 72 horas, no escuro, para medições do crescimento radial das colônias. Na análise microscópica foi empregada a técnica de microcultura, onde foram utilizadas lâminas de vidro esterilizadas para microscopia, adicionando-se no seu centro um disco de meio de cultura BDA (5 mm). Com auxílio de alça de platina ou com estilete flambado e resfriado, pequenas porções de micélio dos isolados foram transferidas para as laterais do disco de BDA. Finalmente, uma lamínula foi acomodada sobre este conjunto, que foi incubado em câmara úmida em uma placa de Petri, por 2 a 3 dias em BOD a 25 °C. Em seguida, o disco foi cuidadosamente retirado para a montagem de duas lâminas semi-permanentes, a partir de cada microcultura. Foram medidos os conídios, conidióforos, fiáldes e clamidósporos com auxílio do software Nikon ACT-1C ligado ao microscópio óptico (Nikon 80i) a 1000X. Realizou-se 30 medições por estrutura. A identificação dos isolados seguiu conforme a chave analítica proposta por Samuels et al. (2011). Posteriormente os isolados foram submetidos a dois métodos de preservação em longo prazo, conhecidos como método Castellani (1939) e método de papel filtro dessecado com sílica gel, descrito por Takatsu (1980). Os isolados foram registrados pela inclusão das informações relevantes em banco de dados próprio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Foram obtidos 589 isolados de diferentes estados, como GO, MG, SP, RS, BA, RN, PR, MS, DF e TO, de solos com diferentes texturas, obtendo-se desta forma uma coleção com ampla abrangência geográfica (Figura 1). Desta coleção, 122 isolados foram avaliados morfológicamente através de aspectos macro e microscópicos sendo identificada *Trichoderma harzianum* como a espécie mais freqüente, encontrada em 39 amostras. Outros isolados foram identificados como *T. asperellum*, *T. aggressivum*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. aureoviride*, *T. gamsii*, *T. erinaceum*, *T. longibrachiatum* e *T. tomanetosum*. Um único isolado foi identificado como *Hypocrea neorufa*, fase perfeita de *Trichoderma* sp. Vinte e dois isolados não se ajustaram a nenhuma espécie descrita na base de dados Trichokey, e possivelmente são espécies novas para este gênero. Foi observado que ambos os métodos de Castellani e Takatsu se mostraram adequados para preservação da coleção, mas, para uma maior segurança, é desejável que este processo ocorra simultaneamente por meio dos dois métodos, visto que sua viabilidade em longo prazo ainda não está determinada.

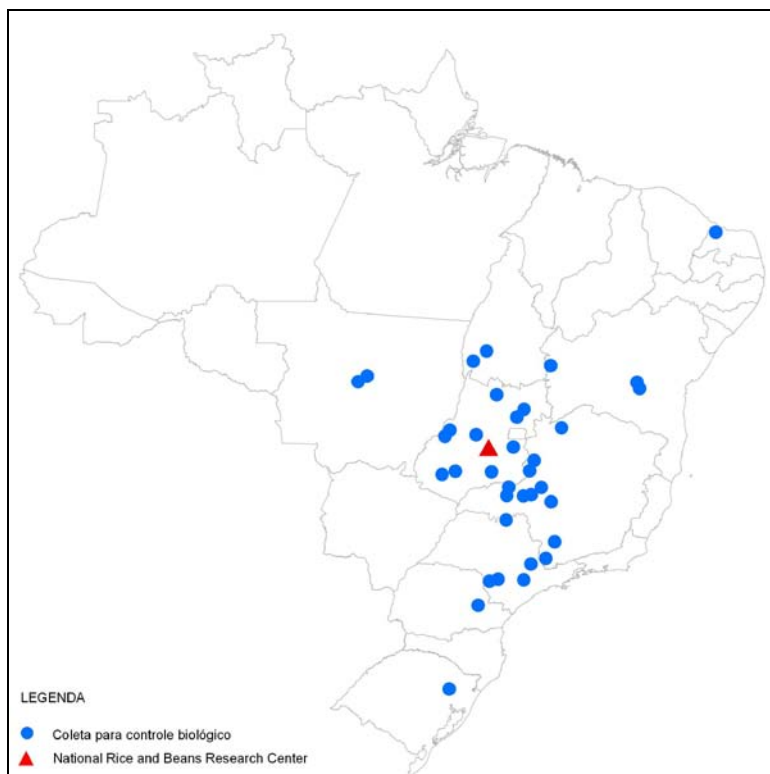


Figura 1. Local de origem de isolados de *Trichoderma* spp. utilizados neste estudo.

CONCLUSÕES: O isolamento de *Trichoderma* spp. a partir de amostras de solo mostrou-se eficiente para a obtenção de um grande número de isolados, pertencentes a várias espécies deste gênero. Foi possível identificar diversas espécies morfológicas de *Trichoderma*, e outras não identificadas podem pertencer a espécies novas.

AGRADECIMENTOS: Ao CNPq e à FINEP, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 24, p. 270-276, 1939.

LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A. M.; CARVALHO, D. D. C. **Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 4 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico, 85).

MELLO, S. C. M. 2008. **Recursos genéticos de microrganismos**. In: Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucional e políticas. v. 2. (ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G.). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 700 p.

MERTZ, L. M., HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D.; Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 13-18, jan-fev, 2009.

SANTOS, R. P.; MACEDO, M. A.; DELGADO, G. V.; MARTINS, I.; MELLO, S. C. M. **Enriquecimento da coleção de agentes de controle biológico de fitopatógenos: Novos isolados de *Trichoderma* procedentes de Petrolina (PE)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 750 p. (Embrapa Recursos Genéticos. Documentos 250).

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. **Trichoderma online, systematic mycology and microbiology 2009**. Disponível em: </taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm >. Acesso em: 10 jun. 2011.

TAKATSU, A. **Preservação de bactérias fitopatogênicas pelo método de dessecação**. Universidade de Brasília. Departamento de Biologia Vegetal. 1985, 5 p. Mimeografado.