



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E FOTOPERÍODO IDEAIS PARA O CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Trichoderma* EM MEIO LÍQUIDO

Jéssica Oliveira e **Silva**^{1a}; Natalia F. dos **Santos**^{2b}; Bernardo A. Halfeld-**Vieira**^{3b}; Marcelo A. B. **Morandi**^{3c}

¹ Ciências Biológicas – Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL); ² Engenharia Florestal – UNESP Botucatu-SP; ³ Embrapa Meio Ambiente

Nº 13422

RESUMO - *Dentre os diversos agentes de biocontrole o Trichoderma é o mais utilizado para combater doenças em plantas por possuir mecanismos de antagonismo diversos. Industrialmente a produção de esporos é realizada em meio sólido, pois sua esporulação em meio líquido ainda é um desafio. Sendo assim, a definição dos parâmetros que promovem a melhor esporulação em fermentação líquida vem sendo investigada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer temperatura e fotoperíodo que sejam ótimos para obter maior produção de esporos com boa viabilidade. No experimento, um isolado Trichoderma asperellum foi cultivado em frascos de 250ml contendo o meio Czapek-Dox e peptona variando-se as temperaturas em 20, 25 e 30 °C entre fotoperíodos 0 (sem incidência de luz), 12 e 24 horas, sendo o arranjo fatorial 3x3. Os frascos permaneceram por um período de 7 dias em 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 faixa de temperatura que promoveu maior concentração de esporos viáveis produzidos foi a de 25 a 30 °C. O fotoperíodo que proporcionou maior estabilidade na produção de esporos viáveis foi o de 12 horas.*

Palavras-chaves: *Trichoderma*, fermentação líquida, temperatura, fotoperíodo

^a Bolsista CNPq; Graduação em Ciências Biológicas, jessicaoliveira600@hotmail.com, ^b Colaborador, ^c Orientador



ABSTRACT- *The most studied and the most widely used biocontrol agent for plant diseases is the fungus Trichoderma. The fungus has multiple mechanisms of antagonism against plant pathogens. Industrially, the mass conidial production is performed in solid media, like rice grains, because its production in liquid medium is not well understood. Therefore, the definition of parameters that stimulated the better sporulation in liquid fermentation is necessary to be investigated. The aim of this work was to establish the best temperature and photoperiod for increased conidial production and viability. Trichoderma asperellum was grown in flasks of 250 mL containing the medium Czapek-Dox and peptone, varying the temperatures (20, 25 and 30 °C) and the photoperiods (0 -no light, 12 and 24 hours), in a 3x3 factorial design. The flasks were kept for a period of seven days on orbital shaker. The following evaluations were performed: conidial concentration, conidial viability (germination), colony forming units (UFC) and total dry weight. Statistical analyses were performed by analysis of variance and Tukey test at 5%. The temperature range that stimulated greater production of conidia with great viability was 25 to 30 °C. The photoperiod that provided more stability on conidial production and viability was 12 hours.*

Key-words: *Trichoderma, liquid fermentation technology, temperature, photoperiod*

1 INTRODUÇÃO

A ausência de resíduos danosos com a aplicação de produtos à base de agentes de controle biológico se configura em uma vantagem de seu uso. A adoção deste método garante a proteção da biodiversidade do solo e também uma maior especificidade, pois não ataca organismos benéficos à cultura. Atualmente, existe no mercado uma razoável variedade de produtos de boa qualidade com custo relativamente mais baixo quando comparado aos produtos químicos. Porém a produção destes em larga escala tem limitações, por demandar muito espaço e mão-de-obra. Além disso, problemas de formulação que levam a uma vida em prateleira curta desses agentes de biocontrole, ainda têm sido fatores limitantes à expansão da indústria deste ramo. A logística empregada nessa área e em muitos casos, as condições ambientais requeridas para a armazenagem de tais produtos geram outro entrave (LOPES, 2009; MENEZES, 2006 POMELLA & RIBEIRO, 2009).

Dentre os inúmeros agentes de controle biológico utilizados em larga escala, os fungos do gênero *Trichoderma* se destacam por apresentarem mecanismos de antagonismos diversos, como



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

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). Já 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, como por exemplo em arroz ou outros cereais, por serem de fácil manipulação e de baixo custo (SINGH 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, além da necessidade de grandes áreas para produção.

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 em prateleira dos produtos (BATTA, 2004).

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o cultivo, utilizou-se o meio líquido Czapek-Dox modificado (NaNO_3 ; K_2HPO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KCl ; FeSO_4 ; 10g da fonte de carbono e 1 litro H_2O destilada). Foi adicionado ao meio a concentração de 1,315 g/L de peptona (relação carbono/nitrogênio 20:1). As temperaturas foram 20, 25 e 30 °C com fotoperíodo de 0 h (sem incidência de luz), 12 h luz/ 12 h escuro e 24 horas de luz incidente, utilizando arranjo fatorial 3x3 com 4 repetições de cada tratamento. Em cada frasco de 250 mL foram colocados 120 mL 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



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

fotoperíodo onde permaneceram por sete dias. Durante a agitação os frascos ficaram expostos à luz fluorescente “branca”. Decorrido este período, 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 H₂O destilada; 16 g Agar e 20 g 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 10⁴ 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 de 10 µL de Triton[®], 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 10³ 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 papéis, que primeiramente permaneceram em estufas de secagem à 55 °C, onde em seguida foram pesados. Após este procedimento, o meio líquido contido nos frascos foi filtrado e os filtros foram mantidos em estufa de secagem por sete dias a 55 °C. Após esta etapa, os filtros foram novamente pesados. Os resultados foram obtidos pela diferença da massa do *Trichoderma* + filtro após a secagem e a massa seca do filtro.

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.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da produção de conídios, verificou-se que na temperatura de 20 °C, quando o fotoperíodo foi fixado em 24 h foram obtidos menores valores quando comparado com 0 e 12 h de luz (Tabela 1). Entretanto, nas demais temperaturas, não houve efeito significativo de fotoperíodo.

Tabela 1. Efeito da temperatura e fotoperíodo na produção de conídios (conídios/ml) de *Trichoderma* em meio líquido .

| Fotoperíodo | Temperatura | | | CV |
|-------------|-------------|------------|------------|----------|
| | 20°C | 25°C | 30°C | |
| 0 h | 16.6425 Aa | 16.6695 Aa | 17.4931 Aa | 2.971934 |
| 12 h | 15.9974 ABa | 17.5290 Aa | 17.3531 Aa | 4.978983 |
| 24 h | 14.0917 Bb | 17.6597 Aa | 17.6733 Aa | 4.156636 |
| CV | 5.979773 | 3.233427 | 3.872728 | |

Letras maiúsculas= comparação no sentido da coluna, letras minúsculas= comparações no sentido da linha. Dados transformados para InLog.

Para o teste de germinação, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da temperatura e fotoperíodo na germinação (%) de esporos de *Trichoderma* produzidos em meio líquido.

| Fotoperíodo | Temperatura | | | CV |
|-------------|-------------|-----------|-----------|----------|
| | 20 °C | 25 °C | 30 °C | |
| 0 h | 99.89% Aa | 99.84% Aa | 99.62% Aa | 0.257290 |
| 12 h | 99.60% Aa | 99.74% Aa | 99.37% Aa | 0.660493 |
| 24 h | 99.95% Aa | 99.65% Aa | 100% Aa | 0.301562 |
| CV | 0.262720 | 0.511316 | 0.573598 | |

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

Na avaliação do número de unidades formadoras de colônia (UFC), verificou-se que no fotoperíodo 24 h, houve uma diminuição no UFC na temperatura 20 °C (Tabela 3).

Na temperatura de 30 °C, a ausência de luz ocasionou redução no número de UFC produzidas, o que também ocorreu quando o fotoperíodo foi fixado em 24 h e a temperatura em 20 °C (Tabela 3).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 3. Efeito da temperatura e fotoperíodo na formação de unidade formadora de colônia (UFC) de *Trichoderma* em meio líquido.

| Fotoperíodo | Temperatura | | | CV |
|-------------|-------------|----------|-----------|----------|
| | 20 °C | 25 °C | 30 °C | |
| 0 h | 41.25 Aa | 46.58 Aa | 37.00 Ba | 30.70616 |
| 12 h | 39.92 Aa | 74.75 Aa | 50.83 ABa | 39.11878 |
| 24 h | 19.67 Ab | 69.25 Aa | 68.83 Aa | 28.65363 |
| CV | 35.65615 | 34.86470 | 26.57190 | |

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

Em relação à produção de massa seca, na temperatura de 20 °C, independentemente do fotoperíodo, foi observada uma redução na biomassa (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da temperatura e fotoperíodo na produção de massa seca (g) de *Trichoderma* em meio líquido.

| Fotoperíodo | Temperatura | | | CV |
|-------------|-------------|-----------|-----------|----------|
| | 20 °C | 25 °C | 30 °C | |
| 0 h | 0.305g Ab | 0.432g Aa | 0.392g Aa | 8.522726 |
| 12 h | 0.280g Ab | 0.407g Aa | 0.390g Aa | 7.861287 |
| 24 h | 0.297g Ab | 0.392g Aa | 0.400g Aa | 4.876214 |
| CV | 8.940359 | 5.442762 | 4.985127 | |

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

O conjunto de resultados, portanto, indica que a produção de esporos viáveis e de massa seca é maior na faixa de 25 a 30 °C. A influência do fotoperíodo não foi muito clara, mas, em geral, obteve-se maior estabilidade de produção quando se utilizou 12 horas de luz.

4 CONCLUSÃO

A faixa de temperatura que promoveu maior concentração de esporos viáveis produzidos foi a de 25 a 30 °C.

O fotoperíodo que proporcionou maior estabilidade na produção de esporos viáveis foi o de 12 horas.



5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

A Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTA, Y.A. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. **Crop Protection**, n. 23, p. 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 conceitos**. (4. ed). São Paulo: Agronômica CERES, 2011. v. 1. p. 383-386.

BONFIM, 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**, v. 36, n. 1, 2010.

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**, v. 87, p. 4-10, 2003.

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 Meio Ambiente, 2009. p. 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 antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotrop**, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

MENEZES, E. L. A. Controle biológico: a busca pela sustentabilidade da agricultura brasileira. Seropédica-RJ: Embrapa Agrobiologia, 2006. Disponível em <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/artigo_controle_biologico.html> Acesso em: 26 de Maio de 2012.

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, p. 243.

SCHIRMBOCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y.L.; HAYES, C.K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G. E; KUBICEK, C. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 43, p. 63-70, 1994.

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. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 470-473, 2006.