

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS**

**MULTIPLICAÇÃO EM LARGA ESCALA DO AGENTE DE
CONTROLE BIOLÓGICO *Trichoderma asperellum***

RENAN AUGUSTO BEDRA

Cruz das Almas – Bahia

Julho - 2019

MULTIPLICAÇÃO EM LARGA ESCALA DO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO *Trichoderma asperellum*

RENAN AUGUSTO BEDRA

“Trabalho de Conclusão de Curso submetido
ao Colegiado de Agronomia do Centro de
Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
da Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia como requisito parcial para obtenção
do título de Engenheiro Agrônomo. ”

Orientador: Carlos Augusto Dórea Bragança

Co-orientador 1: Fernando Haddad

Co-orientador 2: Leandro de Souza Rocha

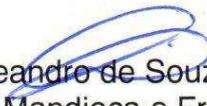
Cruz das Almas – Bahia

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO


Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
UFRB
(Orientador)


Dr. Leandro de Souza Rocha
Embrapa Mandioca e Fruticultura


Profa. Dra. Leilane Silveira D'Ávila
UFRB

Cruz das Almas – Bahia
Julho - 2019

Sumário

Resumo¹	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e métodos	9
Inoculo inicial	9
Suspensão de conídios	9
Ajuste de concentração	11
Preparo do arroz	11
Inoculação	13
Incubação	13
Qualidade final	14
Resultados e discussões	16
Agradecimentos	18
Referências bibliográficas	19

Resumo¹

Multiplicação em larga escala do agente de controle biológico *Trichoderma asperellum*

O controle biológico é uma alternativa para o manejo de fitopatógenos associados ao solo. Adicionalmente, associado a técnicas de manejo, se torna uma importante estratégia de produção sustentável e econômica. O *Trichoderma* spp. tem grande potencial de controle devido aos seus diferentes mecanismos de ação se tornando um dos principais agentes de biocontrole. A partir da demanda interna do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura para experimentos laboratoriais e com o avanço dos estudos em campo, necessitou-se produzir em maior quantidade inóculo de *Trichoderma asperellum* e, com os resultados dos experimentos, a produção se estendeu a propriedades parceiras. Uma das premissas do controle biológico é a redução da utilização de agroquímicos, a produção massal de *Trichoderma asperellum* em arroz é uma opção para a redução das aplicações químicas em campo, assim o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento da metodologia de produção massal sendo possível ser realizada por produtores para consumo na própria propriedade. A partir da metodologia descrita, é possível obter uma produção de 520 kg de arroz colonizado em 15 dias por pessoa com a concentração de 10^{10} conídios/g. Portanto, o procedimento descrito permite a fácil multiplicação do *Trichoderma asperellum* realizada por produtores que tenham como objetivo redução de custos e a produção de alimentos mais sustentáveis.

Palavras chaves adicionais: biocontrole, antibiose, fusariose.

¹ Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Summa Phytopathologica*

Abstract

Large-scale multiplication of the biological control agent *Trichoderma asperellum*

Biological control is an alternative for the management of soil associated phytopathogens. Additionally, associated with management techniques, it becomes an important sustainable and economic production strategy. *Trichoderma* spp. has great control potential due to its different mechanisms of action becoming one of the main agents of biocontrol. From the internal demand of the Embrapa Mandioca and Fruticultura Phytopathology Laboratory for laboratory experiments and with the advancement of the field studies, it was necessary to produce in greater quantity inoculum of *Trichoderma asperellum* and, with the results of the experiments, the production extended to properties. One of the assumptions of the biological control is the reduction of the use of agrochemicals, the mass production of *Trichoderma asperellum* in rice is an option for the reduction of the chemical applications in the field, so the present work had the objective of developing the mass production methodology being possible be carried out by producers for consumption on the property itself. From the described methodology, it is possible to obtain a production of 520 kg of rice colonized in 15 days per person with the concentration of 10^{10} conidia / g. Therefore, the described procedure allows the easy multiplication of the *Trichoderma asperellum* carried out by producers whose goal is to reduce costs and to produce more sustainable food.

Additional key words: biocontrol, antibiosis, fusariosis.

Introdução

A banana é um dos alimentos básicos mais produzidos de ordem mundial, ficando atrás do arroz, trigo e milho (2). A produção no cenário mundial se distribui em três principais regiões, a Ásia com 55,8%, as Américas com 24,7% e a África produzindo 17,9%. Com uma área cultivada próxima a 5,4 milhões de hectares, a produção mundial da fruta em 2016 foi próxima a 114 milhões de toneladas. O Brasil é o quarto maior produtor de banana com uma contribuição de 6% da produção mundial (2). No Brasil os estados que detém a maior produção em 2017 são São Paulo, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais respectivamente, totalizando 50% da produção brasileira (3).

A produção de banana é afetada por diversas doenças durante o seu ciclo, entre elas a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (11). No Brasil, o primeiro registro do fungo foi em 1930 no estado de São Paulo, causando grandes prejuízos na cultivar Maçã. Além disso, a raça 1 do fungo também afeta o subgrupo 'Prata' que é um dos cultivares mais plantados pelos agricultores brasileiros onde apresenta suscetibilidade, causando grandes prejuízos (4,8)

O *F. oxysporum* é um fungo de solo que causa as murchas vasculares, onde o patógeno inicialmente infecta as raízes, em resposta à infecção são produzidas no xilema tiloses, gomas e géis. O xilema tem sua coloração modificada para marrom avermelhado ficando obstruído e assim impedindo toda a translocação de água e sais, onde a planta começa a murchar e além da murcha, observa-se o amarelecimento inicialmente das folhas mais velhas e quebra do pecíolo (11). O controle da murcha de *Fusarium* é dificultado devido sua característica monocíclica, por persistir no solo por longos períodos sem o hospedeiro por meio da formação de clamidósporos. O controle

químico é inexistente e manejos de solo alternativos não obtiveram sucesso em uma produção a longo prazo (7,11).

O controle biológico juntamente com um manejo integrado é uma importante ferramenta para a supressão da doença. A utilização de agentes de biocontrole, como o *Trichoderma asperellum* é uma estratégia que vem sendo muito utilizada no manejo de fitopatógenos associados ao solo (1). O *Trichoderma asperellum* se torna um bom agente de controle biológico por conta de seus diversos mecanismos de ação sobre o patógeno como a liberação de enzimas extracelulares (5), a competição por nutrientes, indução de resistência sistêmica e estimulador de crescimento vegetal (10).

Diante disso, este artigo descreve uma metodologia prática de produção massal do *Trichoderma asperellum* em arroz com utilização no controle biológico, onde o objetivo final é a transferência de tecnologia para unidades produtoras de banana.

Material e métodos

O processo de produção massal de *Trichoderma asperellum* foi desenvolvido e validado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. O isolado de *T. asperellum* CPMF-1007 (código inicial Tri 81) pertence a coleção biológica da Embrapa Mandioca e Fruticultura, o isolado foi validado em experimentos anteriores com potencial antagônico a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e com propriedade inerente a promoção de crescimento. Armazenado no laboratório de Fitopatologia em água estéril e em papel filtro com sílica gel a 8°C±4.

Inóculo inicial

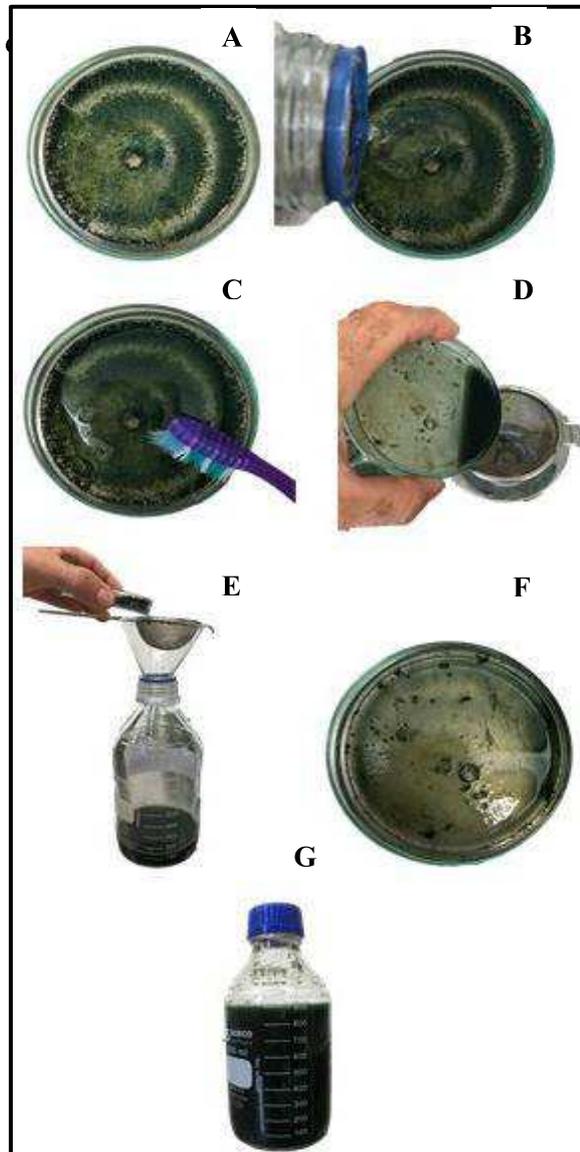
Para o preparo do inóculo inicial, realizou-se a repicagem do isolado para uma placa de Petri contendo meio de cultura batata, dextrose e ágar (BDA). Posteriormente, a placa foi mantida durante sete dias em temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após o período de incubação, a colônia de *Trichoderma asperellum* foi repicada para novas placas contendo BDA, a fim de se obter uma quantidade suficiente de inóculo para o preparo da suspensão inicial de conídios, a depender da quantidade de inóculo a ser produzido.

Em média, uma placa de 90 mm de diâmetro é suficiente para realizar a infestação inicial de 1,5 kg de arroz. As mesmas condições de temperatura e fotoperíodo, citadas anteriormente no processo de incubação, são utilizadas nessa etapa durante sete dias.

Suspensão de conídios

Após esse período, é realizado o preparo da suspensão de conídios. Em cada placa de Petri foi adicionado sobre a colônia de *Trichoderma asperellum* 10 mL de água

destilada esterilizada e realizada a raspagem total da colônia com uma escova de dente. Após a raspagem, a suspensão na placa foi filtrada em uma peneira simples de inox para retirada do excesso



(Figura 1).

Figura 1- **A:** *Trichoderma asperellum* em placa com meio BDA totalmente colonizada após 7 dias na BOD. **B:** Adição de água destilada e esterilizada. **C:** Raspagem superficial da placa com auxílio de uma escova dental desinfestada. **D:** Transferência do material resultante para o recipiente passando por uma peneira para a contenção de materiais indesejáveis. **E:** Demonstração do correto procedimento de transferência. **F:** Placa após a raspagem e transferência do líquido. **G:** Recipiente contendo a suspensão concentrada após raspagem de todas as

Ajuste de concentração

Durante o intervalo de preparo até a inoculação no arroz, a suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum* deve ser armazenar em geladeira. Todo o material utilizado no processo de preparo da suspensão de conídios e inoculação no arroz deve ser esterilizado em autoclave, a temperatura de 121 °C e pressão de 1atm por 20 minutos. A suspensão de conídios é quantificada em câmara de Neubauer em microscópio óptico e ajustada para 10^8 conídios/mL (Figura 2 e 3).

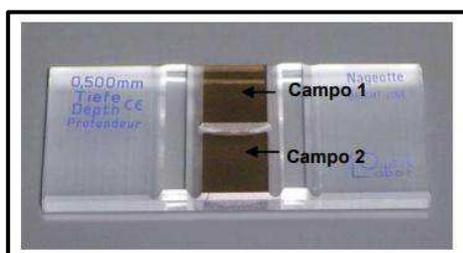


Figura 2- Localização dos campos 1 e 2 para quantificação na câmara de Neubauer

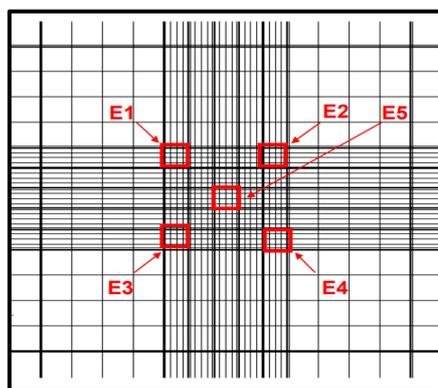


Figura 3- Área dentro dos subcompartimentos vermelhos para contagem de conídios de *Trichoderma* spp.- E1, E2, E3, E4 e E5.

Preparo do arroz

O arroz utilizado como substrato para multiplicação do *Trichoderma asperellum* deve ser o arroz branco. Antes de realizar a infestação com a suspensão de conídios, o arroz foi submerso em água a 100 °C por 10 minutos para realizar o pré-cozimento. Em seguida foi retirado o excesso de água, deixando o arroz escorrer por 10 minutos. O arroz com o aspecto de cozido, mas ainda com os grãos duros, foi fracionado em 0,5 kg em embalagens plásticas, com capacidade para 5 kg. Em seguida realizou-se a autoclavagem à temperatura de 121 °C e pressão de 1atm por 20 minutos. Após essa

etapa, foi necessário deixar o arroz esfriar até atingir a temperatura ambiente para proceder a infestação com conídios de *Trichoderma asperellum* (Figura 4).



Figura 4– **A:** Arroz tipo 1 utilizado na culinária; **B:** Arroz em um recipiente para seu pré-cozimento; **C:** Adição de água à 100 °C; **D:** Fracionamento em embalagens plásticas, contendo em cada 0,5 kg; **E:** Autoclavagem do arroz à temperatura de 121 °C e pressão de 1atm por 20 minutos; **F:** Embalagem após a esterilização em autoclave.

Inoculação

Em cada saco com 0,5Kg de arroz esterilizado foi adicionado 10 mL da suspensão de conídios com uma seringa e agulha esterilizada. Em seguida realizou-se a homogeneização do arroz com a suspensão (Figura 5).

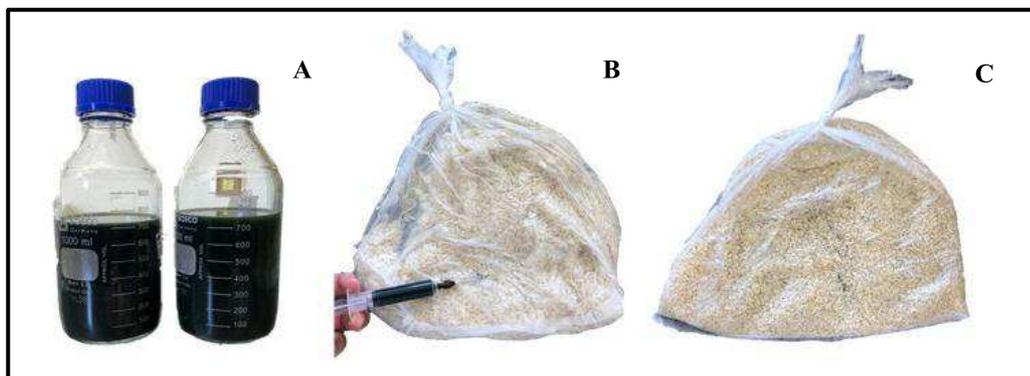


Figura 5– **A:** Suspensão de conídios ajustada para inoculação; **B:** Inoculação com 10 mL da suspensão com auxílio de seringa e agulha estéril; **C:** Arroz homogeneizado após a inoculação.

Incubação

A incubação do arroz infestado com o *Trichoderma asperellum* foi realizada em câmara de crescimento, em temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$, com fotoperíodo de 12 horas. Após 72 horas, o arroz foi revolvido e realizada a abertura de aproximadamente 5cm na embalagem, com uma lâmina de bisturi, para realizar a aeração (Figura 6).



Figura 6 – **A:** Abertura da embalagem para realizar a troca gasosa, corte realizado com auxílio de bisturi estéril; **B:** Após a agitação para homogeneização.

Qualidade final

Deve-se realizar outra agitação após cinco dias da infestação. No final do processo 10 a 15 dias após a infestação do arroz com conídios de *Trichoderma asperellum* as embalagens devem estar com coloração verde escuro predominante (Figura 7). Desejando manter a alta qualidade do agente de controle biológico deve-se realizar as análises de quantificação, pureza e viabilidade do inóculo, conforme metodologia desenvolvida pela Embrapa Meio Ambiente “Curso Teórico e Prático – Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*”, desejando manter a eficiência e qualidade final do produto biológico (Figura 8).



Figura 7- Arroz inoculado com *Trichoderma asperellum* após o decimo dia da inoculação

Durante o processo de incubação, os sacos que apresentarem coloração atípica,

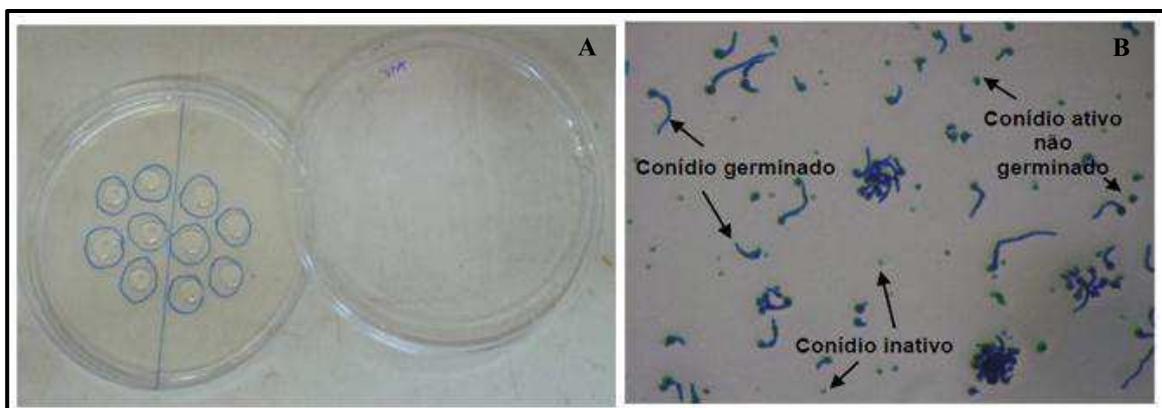


Figura 8 – **A:** Placa contendo amostras do *Trichoderma asperellum* já preparadas para crescimento e avaliação de conídios viáveis. **B:** Vista através de microscópio óptico de conídios de *Trichoderma asperellum* (conídio germinado, conídio ativo não germinado e conídio inativo) após 14 horas de incubação

diferente de verde escuro, devem ser removidos da câmara de crescimento para evitar a contaminação de outras embalagens. Deve-se realizar o monitoramento da velocidade de colonização ao longo do tempo, o aumento da velocidade de colonização, perdas acima de 10% por contaminantes externos, descoloração típica de colonização do *Trichoderma asperellum* e ineficiência de controle em campo são com o objetivo de manter uma cepa eficiente sem perdas de qualidade (Figura 9).



Figura 9- Embalagem da direita com descoloração causada por contaminação externa

Resultados e discussões

Observou-se que após o pré-cozimento do arroz o mesmo teve um aumento de 10% no seu volume. Com a metodologia aplicada conseguiu-se uma produtividade de 520 kg de arroz inoculado com *Trichoderma asperellum* em 15 dias com uma concentração final de 10^{10} conídios/g. Contudo, após a inoculação ocorreu uma contaminação de 10% das embalagens. Ao décimo dia, o arroz foi totalmente colonizado apresentando a cor verde escuro predominante.

Em trabalho realizado por Thangavelu, R. (8), realizando a produção em massa de *Trichoderma harzianum* para o controle da fusariose da banana, onde utilizou os substratos, farelo de arroz, grão de arroz, estrume, pseudocaule de bananeira e folha de bananeira seca. Após testes de crescimento avaliou-se que o melhor crescimento no substrato em estudo foi em folha de bananeira seca, assim descartando como fonte de substrato os grãos de arroz selecionados por esta metodologia, apesar da concentração obtida em folhas de bananeira secas serem maiores quando comparadas as concentrações obtidas nesta metodologia, a multiplicação em arroz é facilitada pelo fácil acesso à matéria prima, simples processo de produção, concentração de conídios superior a de produtos comerciais e são adotados pelos produtores.

No controle biológico um dos objetivos é a diminuição do consumo de defensivos agrícolas nas culturas, a redução do impacto negativos no ambiente e na saúde humana, onde cada vez mais o produtor visa a redução dos custos de produção aumentando sua lucratividade e o mercado consumidor preza por produtos livres de resíduos químicos.

Para atingir o sucesso do controle biológico de um fitopatógeno é necessário um conjunto de técnicas de manejo do cultivo para potencializar a sua eficiência e não dependendo somente do agente de controle biológico.

As inúmeras vantagens da produção do fungo em arroz estão no custo reduzido, pela fácil disponibilidade da matéria prima e do controle de qualidade realizada pelo próprio produtor. Assim, a partir da qualidade final, a dosagem do produto para a utilização em campo foi determinada com a aplicação de 100 g/ha, com aplicações mensais, sendo recomendado a aplicação via irrigação para uma distribuição eficiente e econômica, facilitando o manejo e aumentando a eficiência.

Dessa forma, este artigo descreveu a metodologia de produção massal de *Trichoderma asperellum* em arroz para a produção em laboratórios e em pequenas unidades localizadas nas propriedades interessadas, sendo possível ser realizada pelos produtores.

Agradecimentos

Agradeço a todos os profissionais que contribuíram com esse trabalho e a toda equipe técnica da Embrapa Mandioca e Fruticultura do Laboratório de Fitopatologia contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências bibliográficas

1. Blaya, J., López-Mondéjar, R., Lloret, E., Pascual, J. A., & Ros, M. Changes induced by *Trichoderma harzianum* in suppressive compost controlling Fusarium wilt. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 107, n. 1, p. 112-119, 2013.
2. Faostat. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Roma: FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: maio de 2019.
3. Ibge. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil: IBGE, 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=destaques>. Acesso em: junho de 2019.
4. Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A., & Rezende, J. A. M. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: Kimati; Galli (eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. v. 2. p.113-135, 1997.
5. Monte, E. Understanding Trichoderma: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2001.
6. Ploetz, R. C. Fusarium wilt of banana. **Phytopathology**, v. 105, n. 12, p. 1512-1521, 2015.

7. Ploetz, R. C. Fusarium wilt of banana. **Phytopathology**, v. 105, n. 12, p. 1512-1521, 2015.
8. Ploetz, R. C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015.
9. Thangavelu, R., Palaniswami, A., & Velazhahan, R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 103, n. 1, p. 259-263, 2004.
10. Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 3, p. 1061-1070, 1999.
11. Zago Ethur, L., Blume, E., Brião Muniz, M. F., & Veiga Flores, M. G. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciencia rural**, v. 37, n. 6, 2007.