

ESTRUTURA DO PROJETO DE PESQUISA

1. Título:

PRODUÇÃO DE *Trichoderma asperellum* EM MEIO LÍQUIDO VISANDO O BIOCONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE OCORRÊNCIA EM PLANTAÇÕES DE MARACUJÁ E ALGODÃO.

2. Área (s)/Linha (s) de Pesquisa contempladas (homologadas no CONEPE):

Área: Ciências Biológicas

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Produção Agrícola

3. Resumo (no máximo 300 palavras):

A descoberta de produtos biológicos é uma alternativa que tem demonstrado resultados satisfatórios, principalmente por serem produtos seletivos, de alto controle e baixo custo de aquisição e controlando o patógeno em questão. Muitos micro-organismos atuam como agentes de biocontrole de fungos, bactérias, nematoides predadores, ácaros, entre outros. A interação do fungo com o vegetal causa efeitos diretos, propiciando maior eficiência na absorção de fertilizantes nitrogenados, maior resistência a patógenos, eficiência fotossintética e indução de resistência sistêmica (ISR) a doenças. O fungo *Trichoderma* spp. possui alto potencial antagônico e micoparasítico e muitas linhagens são capazes de reduzir a severidade de doenças de plantas, pela inibição de fitopatógenos no solo e nas raízes. A produção em escala industrial de produtos biológicos a base de *Trichoderma* spp. se baseia no cultivo do fungo em meio sólido utilizando-se grãos cereais em que o fungo cresce e produz conídios. Neste tipo de processo surgem diversos fatores como gradiente de temperatura, pH, umidade, concentração do substrato e tensão de O₂ que contribuem negativamente para a produção. Na produção em meios líquidos, grandes quantidades de biomassa são obtidas em um pequeno espaço físico, em pouco tempo e com baixo custo.

4. Palavras chave (no mínimo 3; no máximo 5):

Controle biológico, *Trichoderma* sp, fermentação, fungos fitopatógenos

5. Introdução:

A descoberta de produtos biológicos é uma alternativa que tem demonstrado resultados satisfatórios, principalmente por serem produtos seletivos, de alto controle e baixo custo de aquisição melhorando assim a microbiota local e controlando o patógeno em questão (VAZ et al., 2011). Muitos micro-organismos atuam como agentes de biocontrole de fungos, bactérias, nematoides predadores, ácaros, entre outros (SOARES; MAIA, 2004).

A interação do fungo com o vegetal causa efeitos diretos, propiciando maior eficiência na utilização de fertilizantes nitrogenados, maior resistência a patógenos maiores e menores, eficiência fotossintética, aumento na absorção de nutrientes, aumento na porcentagem e taxa de germinação de sementes e indução de resistência sistêmica (ISR) a doenças (HARMAN et al., 2012; RYDER et al., 2012).

O fungo *Trichoderma* spp. possui alto potencial antagônico e micoparasítico e muitas linhagens são capazes de reduzir a severidade de doenças de plantas, pela inibição de fitopatógenos no solo e nas raízes. Quando agem como simbiontes endofíticos, conseguem mudar a expressão de genes no vegetal, principalmente em mudas, alterando a fisiologia da planta (BROTMAN, Y. et al., 2013). A maioria dos produtos à base de *Trichoderma* spp. comercializados no mercado mundial visam o controle de fitopatógenos de solo, e mais recentemente, o controle de nematoides.

A atividade de biocontrole de isolados de *Trichoderma* spp. é intensamente estudada, devido principalmente à produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras de parede celular de fungos, tais como quitinases, β -1, 4-glucanases e proteases (CORABI-ADELL, 2002). SILVA et al., (2011) em estudo constataram a habilidade de *Trichoderma asperellum* em produzir as enzimas líticas extracelulares. A capacidade de *Trichoderma* spp. em degradar quitina permite que esses fungos atuem no controle de nematoides, uma vez que o ovo é constituído por este polímero. O fungo *Trichoderma asperellum* é um dos principais agentes de controle biológico de doenças de plantas (REZENDE et al., 2011).

Os fungos fitopatogênicos a serem avaliados são *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae* de ocorrência em maracujazeiro e *Ramularia areola* de ocorrência na plantação de algodão. O projeto tem por finalidade avaliar a eficiência do produto à base de *Trichoderma asperellum* obtido por fermentação em meio líquido no controle de fungos fitopatógenos.

6. Objetivos Gerais:

1- Avaliar a eficiência de conídios de *Trichoderma asperellum* produzidos em meio líquido no biocontrole de fungos fitopatogênicos e as propriedades micotóxicas do caldo de cultivo.

7. Objetivos Específicos:

- 1- Cultivo de *Trichoderma. asperellum* em meio líquido para a produção de conídios;
- 2- Determinação a viabilidade dos conídios de *Trichoderma. asperellum*;
- 3- Avaliação da virulência através do cultivo pareado;
- 4- Avaliação da atividade micotóxica do caldo de cultivo;
- 5- Avaliação do tempo de prateleira do produto fúngico.

8. Justificativa:

Este estudo justifica-se pela necessidade de conhecer a atividade de biocontrole do *Trichoderma asperellum* produzido em meio líquido comparado com produtos obtidos por fermentação sólida. Os custos de uma produção em meio líquido são menores, por requererem menos de mão de obra, menor espaço físico e menor tempo de produção.

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Essa cultura ganhou espaço no cenário do agronegócio por apresentar um alto rendimento e qualidade de fibra com geração de renda aos cotonicultores. Contudo, o alto custo de produção dessa herbácea faz com que se busque por formas de manejo da cultura que minimizem as perdas em produtividade. As doenças estão entre os fatores que mais reduzem os ganhos em produtividade. A principal doença da cultura, na atualidade, é a mancha de ramulária (*Ramularia areola*). Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de maracujá, a produtividade nacional é muito baixa. Além disto, observa-se redução na área plantada no país. A incidência de várias doenças nos pomares de maracujazeiro, aliada à inexistência de cultivares resistentes, tem contribuído para a redução da área plantada. Também o número limitado de produtos fitossanitários registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle de doenças da cultura agrava mais ainda a situação dos pomares, a ponto de reduzir o tempo de exploração econômica da cultura, podendo até mesmo inviabilizar seu cultivo em determinadas regiões. A murcha de Fusarium é a principal doença da cultura, esta é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen f. sp. passiflorae, que permanece no solo por muitos anos na forma de clamidósporo, inviabilizando o cultivo do maracujazeiro em algumas áreas.

9. Resultados Esperados:

Espera-se que o produto obtido tenha eficiência contra os fungos fitopatógenos e que as micotoxinas tenha propriedades antifúngicas. Também que os produtos tenham uma vida de prateleira de um ano.

10. Hipóteses ou Questões Problemas:

1. Que os conídios de *Trichoderma asperellum* produzido em meio líquido tenham viabilidade e virulência contra os fitopatógenos.

11. Material e Métodos:

11.1 Obtenção, manutenção da cultura e produção de inóculo

Para o experimento será utilizado a linhagem de *T. asperellum* isolado de um produto comercial. Os fungos fitopatógenos fazem parte da coleção do Laboratório de fitopatologia sob a coordenação da Profa. Dra. Dejânia Vieira de Araujo. Os fungos serão cultivados em meio batata dextrose ágar-BDA e incubado em B.O.D. a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz a 25 °C por até 7 dias e após serão estocado a 4 °C.

Para a produção de inóculo de *Trichoderma asperellum*, após o crescimento, em câmara de fluxo laminar a massa micelial será raspada e suspensa em solução salina mais 0,01% Tween 80, a suspensão será filtrada em lâ de vidro estéril. Para a quantificação dos conídios será realizada a contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico em aumento de 250x.

11.2 Cultivo de *T. asperellum* em meio líquido para produção de conídios

O fungo será cultivado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio cultura, meio Czapek-Dox modificado, pH ajustado em 5,5 com solução de HCl 1 molL^{-1} ou NaOH 1 molL^{-1} , após os frascos serão autoclavados por 15 min a 1 atm de pressão a 121 °C. Os frascos serão inoculado com 2 mL de uma suspensão contendo 2×10^6 conídios mL^{-1} e incubado em mesa incubadora a 180 rpm, a 30 °C por 7 dias. Após a suspensão de conídios será obtido através da filtração do caldo de cultivo, após o filtrado será centrifugado a 3.200 rpm a 15 °C por 10 min, o precipitado será resuspenso em um menor volume de caldo filtrado ou solução salina e serão estocado sob refrigeração para uso posterior.

11.3 Produção de *T. asperellum* em substrato sólido

Para a produção em fermentação sólida um suspensão do inóculo de *T. asperellum* será inoculado em arroz tipo 1 esterilizado e incubado por sete dias em BOD sob fotoperíodo de 12h claro/escuro. Após o arroz colonizado pelo fungo será seco sob baixa umidade e temperatura de 30 °C, após será peneirado e obtido os conídios de *T. asperellum*.

11.4 Determinação da viabilidade dos conídios de *T. asperellum*

Alíquotas da suspensão de conídios serão inoculadas em placas de Petri contendo ágar/água e incubadas por 2 dias. Após as placas serão observadas em microscópio óptico na objetiva de 20x, e serão quantificadas em três campos distintos e determinada a porcentagem.

11.5 Avaliação da virulência através do cultivo pareado

Disco de 6 mm de diâmetro contendo micélio do fitopatógeno com seis dias será transferido para uma extremidade da placa de Petri contendo o meio BDA, e após 72 horas, disco de micélio do de *Trichoderma asperellum* com cinco dias, será inoculado a 3 cm de distância da colônia do fitopatógeno. O controle será representado pelo fitopatógeno sem a presença do antagonista. As placas serão mantidas a 26 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após seis dias de incubação serão realizadas as medidas da colônia do fitopatógeno, conforme técnica de cultura pareada adaptada de MORETTO et al. (2001). Para estudos de interação de hifas, uma lamínula esterilizada será colocada entre as duas colônias opostas (MARTINS-CORDER & MELO, 1998).

11.6 Avaliação da atividade micotóxica do caldo de cultivo

O caldo de cultivo será filtrado a vácuo em papel filtro (Wattman nº1) e esterilizado em membrana Millipore de 0,4 µm e de 0,2 µm. Para avaliar a atividade dos metabólitos, amostras de 10 mL do filtrado esterilizado serão transferidas para frascos contendo 90 mL de BDA fundente (aproximadamente 45 °C). Em seguida, será vertido para placas de Petri (25 mL). Disco de 6 mm de diâmetro do fitopatógeno será transferido para o centro da placa e incubado a 26 °C durante seis dias. Serão realizadas seis repetições e o controle consistirá em meio contendo somente BDA. As avaliações serão realizadas medindo-se o raio da colônia de fitopatógeno após quatro dias de incubação.

11.7 Avaliação do tempo de prateleira do produto fúngico

Após o processo fermentativo o caldo de cultivo será filtrado em lã de vidro e a suspensão de conídios será concentrada e resuspensa em um volume menor do caldo fermentado, tendo a sua concentração ajustada para 1×10^9 conídios mL⁻¹. A suspensão será estocada em frascos escuros e armazenado em temperatura ambiente e geladeira à 4 °C. A viabilidade será determinada a cada quatro meses por período de um ano.

11.8 Análises

Em todos os testes foi realizada Análise de Variância (ANOVA) através do software Assistat Versão 7.5 beta®. O delineamento experimental será inteiramente casualizado e as médias foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

12. Referencial Teórico:

A produção em escala industrial de produtos biológicos a base de *Trichoderma* spp. se baseia no cultivo do fungo em meio sólido utilizando-se grãos cereais (SINGH et al., 2007) em que o fungo cresce e produz conídios. Neste tipo de processo surgem diversos fatores como gradiente de temperatura, pH, umidade, concentração do substrato e tensão de O₂ que contribuem negativamente para a produção (HÖLKER et al., 2004). O processo de manipulação destes substratos requer um longo período de fermentação contribuindo assim para a contaminação por fungos e bactérias. Esta atividade também requer um amplo espaço físico e intensiva mão-de-obra. Todos estes fatores contribuem negativamente o sucesso do controle biológico. Na produção em meios líquidos, grandes quantidades de biomassa são obtidas em um pequeno espaço físico e em pouco tempo. As principais dificuldades do processo estão na obtenção de meios de cultura adequados, na determinação de condições favoráveis para o desenvolvimento e esporulação e na prevenção de contaminações (JACKSON, 1996; JACKSON et al., 1997).

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. HADDAD (2014) em estudos sobre a avaliação da produção de conídios de *Trichoderma* spp. em meio líquido com de 1% de levedura desidratada obteve rendimento de até $1,2 \times 10^8$ conídios mL⁻¹. DIAS (2014), em estudo sobre o efeito de extrato de *Trichoderma* spp. sobre a germinação de sorgo constatou que houve um aumento de até 15% em relação ao controle. A produção de *Trichoderma* spp. em fermentação líquida após a concentração dos conídios gera um excedente de caldo de cultivo que é rico em compostos metabólitos, como as micotoxinas, que podem ter aplicação no controle fitopatogênicos. Metabólitos produzidos por fungos pertencente ao gênero *Trichoderma* sp. tem sido foco de uma atenção considerável ao longo dos últimos anos, devido ao potencial como agentes de controle biológico de uma variedade de patógenos de plantas (DAOUBI et al., 2009).

Esta pesquisa tem por finalidade avaliar a eficiência do produto à base de *Trichoderma asperellum* obtido por fermentação em meio líquido contra fungos fitopatogênicos. Os fungos fitopatogênicos a serem avaliados são *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae* e de ocorrência em

maracujazeiro e *Ramularia areola* de ocorrência na plantação de algodão.

13. Cronograma de Atividades:

Atividade	Período (Semestre)
Cultivo de <i>T. asperellum</i> em meio líquido para a produção de conídios;	02/2017
Determinação a viabilidade do conídios de <i>T. asperellum</i> ;	01/2018
Avaliação da virulência através do cultivo pareado;	01/2018 à 02/2018
Avaliação do tempo de prateleira do produto fúngico	01/2019
Avaliação da atividade micotóxica do caldo de cultivo;	02/2019

14. Referências Bibliográficas (Conforme Normas da ABNT):

BROTMAN, Y. et al. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003221, mar. 2013.

CORABI-ADELL, C. et al. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Archive Institute Biologic**, São Paulo, 2002, v.69 (supl.), p.1-306.

DAOUBI, M.; PINEDO-RIVILLA, C.; RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; MONTE, E., ALEU, J.; COLLADO, I.G. Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma* spp. **Tetrahedron**, v. 65, p. 4834-4840, 2009.

HARMAN, G. E. et al. Special issue: *Trichoderma* - from basic Biology to Biotechnology. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 1–2, jan. 2012.

JACKSON, M. A. et al. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, v. 10, p. 645–650, 1996.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 180–187, 1997.

Haddad, P. E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Meloidogyne incognita* em soja e produção em meios líquidos**. São Paulo, 2014. 100p.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.175-186, 2004.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 1-7, 1998.

REZENDE. L.C.; Z.V. PINTO; W. BETTIOL. Efeito da aeração sobre a produção de esporos de *Trichoderma asperellum* na fermentação líquida. **Summa hytopathologica**, 2011.

RYDER, L. S. et al. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. 1, p. 84–97, 2012.

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, 2007.

SILVA, BARBARA DUMAS S.; J.; Batista, Karla A.; YAMASHITA, FÁBIO; FERNANDES, KA'TIA F. Potential Fungal Inhibition by Immobilized Hydrolytic Enzymes from *Trichoderma asperellum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8148-8154, 2011.

SOARES, P. L. M; SANTOS, J. M. Fungos contra nematoides. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, v. 27, p. 6-8, 2004.

VAZ, M. V. et al. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incógnita* com *Bacillus subtilis*. **PERQUIRERE Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**. Patos de Minas: UNIPAM, n. 8, vol. 1, jul. 2011, pp. 203-212. ISSN: 1806-6399.