



Foto: Itamar Soares de Melo (Embrapa Meio Ambiente)

Desenvolvimento de uma Formulação Granulada a Base de *Trichoderma harzianum* para Controle de Fitopatógenos

Itamar Soares de Melo¹
Francisco Gheller Costa²

Introdução

Um aspecto extraordinário da inovação tecnológica visando à formulação de fungos envolve o encapsulamento de microrganismos em microcápsulas ou "pellets". Polímeros, tais como alginato, poliacrilamida e carragininina têm sido usados para imobilizar bactérias, fungos e enzimas. Até o momento, géis de alginato têm sido usados mais extensivamente para formulação de inoculantes. Os alginatos são sais monovalentes de ácidos alginícos extraídos de diferentes tipos de algas marrons. São disponíveis como sais solúveis em água, tais como: alginato de amônia, alginato de cálcio e alginato de sódio; ou como sal de cálcio insolúvel em água. Este método consiste em misturar uma biomassa fermentada com adjuvantes, em uma solução de alginato de sódio. Aditivos, como nutrientes químicos ou resíduos agrícolas podem ser introduzidos às formulações. A mistura é então gotejada em uma solução contendo um sal de cálcio a fim de solidificar tal mistura.

As partículas formadas são secas de modo a facilitar seu manuseio, armazenamento, aplicação e comercialização. Alguns relatos sugerem que este tipo de formulação se apre-

sentada adequada para armazenamento a baixa temperatura. Sob temperatura ambiente, a vida de prateleira dessa formulação ainda é uma limitação que deve ser melhor estudada.

Na preparação do granulado algumas variáveis devem ser consideradas, tais como: concentração do princípio ativo, tipo e concentração do polímero, tipo e concentração do inerte, volume da solução geleificante e tempo de permanência dos grânulos na solução salina.

A eficácia, praticidade e segurança das estratégias e métodos para aplicação e manutenção desses fungos são fundamentais tanto para o sucesso do biocontrole nos sistemas de cultivo, quanto para a aceitação do biocontrole pelos agricultores e sociedade. Para o microrganismo introduzido, as considerações mais importantes incluem: viabilidade, formulações e concentrações dos organismos de biocontrole; tipos de adjuvantes empregados; eficiência e intervalos de aplicações dos organismos etc. Além desses, o tipo e incorporação do substrato e a dispersão do inoculo, a partir desse substrato, para o meio de cultivo são de extrema importância (Medugno, 1995).

¹Eng. Agrônomo, Doutor em Genética, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340 - Km 127,5 - Cep 13820-000, Jaguariúna, SP. itamar@cnpma.embrapa.br

²Eng. Agrônomo, Mestre em Biotecnologia, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340 - Km 127,5 - Cep 13820-000, Jaguariúna, SP.

fgcosta_agro@yahoo.com.br

Dentre os fungos agentes de controle de fitopatógenos que mais têm despertado o interesse dos agricultores, destacam-se os gêneros *Trichoderma* e *Gliocladium (Clonostachys)*. São fungos saprófitas e hiperparasitas que também atuam produzindo enzimas extracelulares e antibióticos, o que eleva sua capacidade competitiva e eficiência.

A falta de formulações adequadas de fungos para controle de fitopatógenos tem sido um sério entrave na comercialização de agentes de controle biológico. Assim, esse trabalho visa obter uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* que mantenha sua estabilidade e viabilidade. Desse modo, vários polímeros e fontes nutricionais foram avaliados quanto a esses atributos.

Material e Métodos

Linhagem de *Trichoderma*. Uma linhagem de *Trichoderma harzianum*, TSS-9, isolada a partir de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* foi usada neste estudo.

Imobilização de Conídios. Conídios de *T. harzianum* TSS-9 foram produzidos em meio extrato de aveia-ágar, cujo fungo foi cultivado por 10 dias a 28 °C no escuro. Para encapsulamento de conídios, empregou-se a metodologia proposta por Sanhueza & Melo (1995), com algumas modificações. Estas corresponderam à adição de farelo de trigo e carboximetilcelulose como fontes nutricionais, como também empregou-se pectina cítrica como polímero natural. Desse modo, os tratamentos correspondentes às misturas das formulações avaliadas foram os seguintes: T1 – 5g de caulim; 1% de alginato; T2 – 5g de caulim; 0,5% de alginato; 1g de CMC; T3 – 5g de caulim; 0,5% de alginato; 1g de pectina; T4 – 2,5g de caulim; 1% de alginato; 2,5g de farelo de trigo; T5 – 5g de caulim; 2% de alginato; T6 – 2,5g de caulim; 2% de alginato; 2,5g de farelo de trigo.

Os géis, produzidos com auxílio de uma bomba peristáltica (Fig. 1), foram formados em uma solução de cloreto de cálcio (0,25M). Após secagem a 30 °C em estufa de ventilação forçada os grânulos foram armazenados em duas temperaturas distintas, a 26 e 4 °C.



Fig. 1. Bomba peristáltica para produção de géis.

O processo de encapsulamento foi repetido três vezes consecutivas, quando empregado ingredientes que propiciam maior sobrevivência do fungo, tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. Desse modo, o processo foi repetido para a formulação, correspondente ao T4 que inclui farelo de trigo como carregador.

Determinação da Viabilidade da Formulação. A viabilidade do fungo imobilizado nos diferentes ingredientes foi avaliada plaqueando-se 20 grânulos em meio BDA (Batata-dextrose-ágar). Após incubação a 28 °C por 24 horas, considerou-se viável o grânulo que apresentou germinação dos propágulos fúngicos.

Potencial do Fungo Formulado em Hiperparasitar o Fitopatógeno. O potencial do fungo formulado em hiperparasitar o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* foi avaliado colocando um grânulo na extremidade de uma placa de Petri contendo BDA e, na outra extremidade, um disco de 5 mm de diâmetro de meio BDA contendo crescimento de *R. solani*. As interações fúngicas foram incubadas a 28 °C e, durante 7 dias, o grau de parasitismo de *Trichoderma* foi monitorado por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Observações Microscópicas do Parasitismo. As amostras foram pré-fixadas em glutaraldeído 2%, lavadas com tampão fosfato de sódio 0,1M, fixadas com tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% por 30 minutos e lavadas novamente, com tampão fosfato de sódio 0,1 M. Após a lavagem com o tampão, foi feita desidratação em série crescente com acetona (25, 35, 50, 70, 80 e 90%). As amostras foram secas em ponto crítico (Emitech), metalizadas (metalizador Emitech) com ouro por 3 minutos com 30 mA e observadas em um microscópio eletrônico de varredura, Gemini Leo 982, Leica-Zeiss.

Resultados e Discussão

Para análise dos dados referentes às formulações contendo os diferentes polímeros e fontes nutricionais foi inicialmente considerado o potencial dos conídios do fungo em germinar a partir dos grânulos (Fig. 2). A porcentagem de germinação de grânulos germinados foi avaliado periodicamente, perfazendo um total de 60 dias. (Tabela 1).

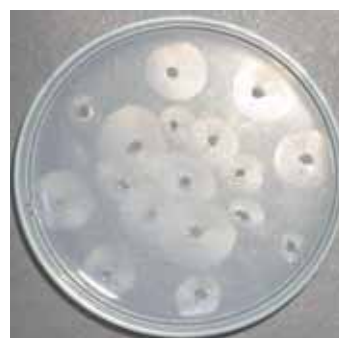


Fig. 2. Germinação miceliana de *Trichoderma harzianum* a partir dos grânulos incubados em meio BDA.

Tabela 1. Viabilidade de *Trichoderma harzianum* TSS-9 quando formulado com polímeros e nutrientes distintos, 10 e 60 dias após preparo. Porcentagem de germinação dos grânulos nas temperaturas 26 e 4 °C.

Dias após o preparo	Tratamentos	Germinação (%)	
		26 °C	4 °C
10	T1	5,88	94,12
	T2	14,71	100,00
	T3	0	73,53
	T4	100,00	100,00
	T5	88,24	100,00
	T6	100,00	100,00
60	T1	0	47,06
	T2	0	61,77
	T3	0	0
	T4	52,94	100,00
	T5	97,06	100,00
	T6	100,00	100,00

Grânulos formados com pectina apresentaram-se desuniforme quanto à morfologia, enquanto aqueles formados com alginato foram mais regulares. Um outro aspecto observado foi a maior produção de conídios de *T. harzianum* a partir dos grânulos formados com farelo de trigo. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados por Knudsen *et al.*, (1990) com o entomopatógeno *Beauveria basiana* e por Lewis e Papavizas (1995) com *Trichoderma* sp. que empregaram farelo de trigo como base nutricional nas formulações com alginato.

Grânulos de alginato contendo esporos de vários fungos e células bacterianas com pirofilita têm sido formados visando a aplicação no controle biológico (Fravel *et al.*, 1985). No presente trabalho, a formulação de *T. harzianum* contendo alginato e farelo de trigo apresentou uma maior taxa de sobrevivência do fungo, quando este foi armazenado a 4°C.

A inclusão do farelo de trigo favoreceu uma maior estabilidade e viabilidade do fungo, assegurando uma maior duração do formulado no armazenamento. Quando avaliada após 2 anos de armazenamento, a formulação contendo farelo de trigo mostrou ser mais eficiente em preservar o fungo com capacidade para crescer e parasitar o fitopatógeno *R. solani*. (Fig. 3).



Fig. 3. Avaliação da viabilidade de *Trichoderma harzianum* quanto à capacidade de antagonizar *Rhizoctonia solani*. A imagem de microscopia eletrônica de varredura mostra o parasitismo do antagonista sobre o seu hospedeiro.

Observações ultra-estruturais dos grânulos e do crescimento de *T. harzianum* sobre eles são vistas na Fig. 4. A Fig. 4A mostra a estrutura de um grânulo seco, de formato irregular, sem nenhum crescimento fúngico. A Figura 4B mostra o crescimento miceliano típico de *Trichoderma* recobrendo totalmente o grânulo, após 24 horas de incubação. Essas observações vêm reforçar a viabilidade do fungo, após imobilização dos conídios com os ingredientes adicionados.

Após re-hidratação, os grânulos esporularam profusamente dentro de 36 horas a temperatura ambiente.

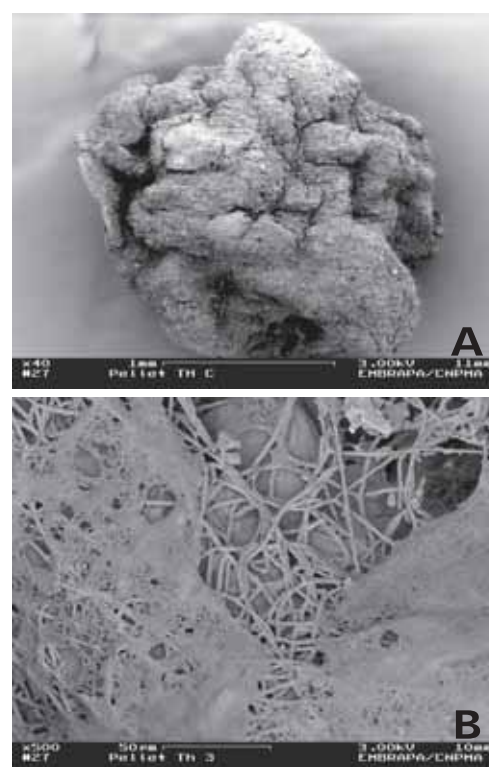


Fig. 4. Morfologia tridimensional de um grânulo visto sob microscopia de varredura. (A) Grânulo seco. (B) Germinação miceliana de *Trichoderma harzianum* a partir de um grânulo feito com farelo de trigo e alginato.

Referências bibliográficas

FRAVEL, D.R.; MAROIS, J.J.; LUMSDEN, R.D.; ONNICK JR., W. J. Encapsulation of potential biocontrol agents in sodium alginate aggregates. *Phytopathology*, v.75, p.747-777, 1985.

KNUDSEN, G.R.; BIN, L. Effects of temperate, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. *Phytopathology*, v.80, p.724-727, 1990.

LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. *Plant Pathology*, v.34, p.571-577, 1985.

MEDUGNO, C. Formulação de agentes microbianos para o controle de fitopatógenos. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. (Coord.). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1995. p.47-59. (Embrapa-CNPMA. Documentos, 1).

SANHUEZA, R.M.V.; MELO, I.S. Encapsulamento de microrganismos. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. (Coord.). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1995. p.60-63. (Embrapa-CNPMA. Documentos, 1).

Comunicado Técnico, 31

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

Endereço: Rodovia SP-340 - Km 127,5

Tanquinho Velho - Caixa Postal 69

Cep.13820-000 - Jaguariúna, SP

Fone: (19) 3867-8700

Fax: (19) 3867-8740

E-mail: sac@cnpmembrapa.br

1ª edição

Comitê Local de Editoração

Presidente: *Ladislau Araujo Skorupa*

Secretário-Executivo: *Sandro Freitas Nunes*

Membros: *Cláudio César de Almeida Buschinelli; Heloisa Ferreira Filizola; Manoel Dornelas de Souza; Maria Conceição Peres Young Pessoa; Marta Camargo de Assis; Osvaldo Machado R. Cabral*

Expediente

Normalização Bibliográfica: *Maria Amélia de Toledo*

Editoração Eletrônica: *Silvana Cristina Teixeira*