

## PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE *Trichothecium roseum* PARA USO COMO BIOPESTICIDA

## PRODUCTION AND STORAGE OF *Trichothecium roseum* TO USE AS BIOPESTICIDE

Genuino NEGRI<sup>1</sup>  
Louise Larissa MAY DE MIO<sup>2</sup>  
João Américo WORDELL FILHO<sup>3</sup>

### RESUMO

*Trichothecium roseum* tem potencial como fungo antagonista para controle de podridão parda no pessegueiro reduzindo a infecção do patógeno e danos com a doença. O presente experimento buscou desenvolver uma metodologia para produção do antagonista *Trichothecium roseum* em diferentes substratos e testar sua viabilidade quando armazenado em ambientes com temperaturas variadas. Os substratos utilizados foram o arroz integral, casca de arroz, sorgo granífero e trigo em grão fervidos em água de torneira por 5, 10 e 20 min e sem ferver com e sem adição de nutrientes e com quatro repetições. A avaliação de viabilidade do inóculo armazenado foi testada nas temperaturas de -4, 4, 15, 25 e 35 °C e a temperatura ambiente, por 90 dias. As análises de variância indicaram interações significativas entre os substratos utilizados, os tempos de fervura e os tipos de tratamento com o uso ou não de nutrientes sobre os mesmos. Os substratos de arroz e trigo sem adição de nutrientes BD (batata + dextrose) foram eficientes na produção do antagonista demonstrando que os mesmos não necessitam da adição de nutrientes para a multiplicação do fungo. O ambiente de armazenamento do inóculo que manteve uma melhor viabilidade dos conídios foi na temperatura de -4 °C onde as taxas de viabilidade foram de 74% aos 30 dias, 44% aos 60 dias e 32% aos 90 dias, sendo que, esta temperatura pode ser facilmente conseguida em freezer de geladeira, dispensando grandes investimentos dos usuários em equipamentos para conservação do antagonista.

**Palavras-chave:** Controle biológico; produção de inóculo; substratos; *Monilinia fructicola*.

### ABSTRACT

*Trichothecium roseum* is a potential antagonistic fungus to control peach Brown rot reducing the pathogen infection and disease damage. The current experiment aimed at developing a methodology for production of the antagonist *Trichothecium roseum* in different substrates, and to test its viability when stored in several temperatures. The substrates used were brown rice, rice hulls, sorghum grain and wheat grain boiled to tap water for 5, 10 and 20 min and not boiled, with and without added of nutrients with four repetitions. The evaluation of the stored inoculum viability was tested in temperatures: -4, 4, 15, 25, 35 °C and room temperature, for 90 days. The analysis of variance indicated significant interactions among the substrates, the time of boiling and the types of treatment with or without the use of nutrients. The rice and wheat substrates without PD (potato + dextrose) nutrients addition were the more efficient in the production of the antagonist, demonstrating that these do not require the addition of nutrients for multiplication of the fungus. To maintain the viability of the inoculum the best storage condition was at temperature -4 °C, where of rates in viability of the conidia were 74% at 30 days, 44% at 60 days and 32% at 90 days; this temperature can easily be obtained in freezers; therefore, future users do not need to make high investments in equipment for the conservation of the antagonist.

**Key-words:** Biological control; production of inoculum; substrates; *Monilinia fructicola*.

<sup>1</sup> Professor da Escola Agrotécnica Federal de Rio do Sul, SC. Doutor em produção vegetal pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua Ladeira Fortaleza 270, CEP: 89.160.000. Rio do Sul, Santa Catarina, Brasil. E-mail: genuinegri@hotmail.com Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Professora Dra. do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Cx. Postal 19061, CEP 80.035-50, Curitiba, Paraná, Brasil. E-mail: maydemio@ufpr.br

<sup>3</sup> Pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI/ SC). Doutor em fitopatologia, Cx. Postal 791, CEP 89.801.970, Chapecó, Santa Catarina, Brasil. E-mail: wordell@epagri.rct-sc.br

## INTRODUÇÃO

A restrição mundial ao uso de produtos químicos para o controle de doenças das plantas força os meios científicos a buscarem novas alternativas ao controle de fitopatógenos, como o controle biológico, a fim de atender as exigências do mercado consumidor (Stadnik & Talamini, 2004).

Atualmente diversos antagonistas vêm sendo utilizados no controle de doença das plantas como *Trichoderma* spp. para controle de patógenos do solo, *Hansfordia pulvinata* (Berk. e M.A. Curtis) S. Hughes, para controle do mal-das-folhas da seringueira, *Acremonium* sp. para controle da lixada-coqueiro e *Chonostachys rosea*, (Link:Fr.) para o controle de *Botrytis* spp. em morangueiro (Bettiol, 1991; Bettiol & Ghini, 2004).

Algumas metodologias para produção de antagonistas específicos já foram desenvolvidas e são conhecidas como é o caso do *Trichoderma* sp. produzido em semente de sorgo sacarino e arroz, *Epicothium nigrum* Link, em substratos de vermiculita, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., em substrato de sorgo, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, em sementes de trigo, *Chonostachys rosea*, produzido em grão de arroz branco, entre outros (Leoni & Ghini, 2003; Larena et al., 2004; Costa & Costa, 2004; Bettiol & Ghini, 2004; Viccini et al., 2007).

O fungo *Trichothecium roseum* (Pers.) Link é um fungo residente em pomares de pessegueiro, capaz de desenvolver-se saprofiticamente o que lhe garante a sobrevivência em restos de cultura, restos de animais em decomposição e sobre frutos em decomposição ou mumificados. Este fungo foi observado nos Estados Unidos, sobre frutos mumificados de pêssegos e nectarinas *Prunus persica* (L.) Batsch var. *nucipersica* provenientes de pomares comerciais (Hong & Michalides, 1997).

No Brasil, o fungo *T. roseum* (isolado UFPR-F4) foi obtido de frutos de pêssegos e ameixas *Prunus salicina* Lindley, provenientes de pomares convencionais em 1997 na Universidade Federal do Paraná e submetido a testes *in vitro* e *in vivo* para controle da podridão parda causada por *Monilinia fucticola* (G. winter) Honey, com resultados de controle de até 83% em flores, e 85% em lesões latentes em frutos de pêssego (Moreira, 1999; Moreira et al., 2002). Em trabalho mais recente, no Estado de Santa Catarina este mesmo fungo foi testado nas cultivares de pessegueiro Granada e Chimarrita nos anos de 2004, 2005 e 2006, apresentando redução da doença de até 95% em flores, 77% em frutos verdes, 55% na colheita e 50% em pós-colheita comparadas à testemunha (Negri, 2007).

O cultivo do fungo *T. roseum* para uso nos trabalhos desenvolvidos nestes últimos anos foi basicamente em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e posteriormente inoculados em substrato de grãos de trigo conforme metodologia adotada por Moreira (2005) cujo inóculo tinha como objetivo a aplicação imediata.

Na tentativa de encontrar formas simples de

produção e armazenagem do antagonista *T. roseum*, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de uma metodologia de produção desse antagonista em diferentes substratos e testar sua viabilidade quando armazenado em ambientes com temperaturas variadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

A multiplicação do fungo foi feita *in vitro* retirando-se discos de 0,5 cm de diâmetro de BDA contendo o fungo *T. roseum* (isolado UFPR-F4) em pleno desenvolvimento e transferidos para o centro de placas de Petri em meio BDA e em seguida incubadas por 10 dias a uma temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Para o preparo do inóculo, foram utilizados os substratos de arroz integral descascado, casca de arroz, sorgo granífero ou trigo em grão. Todos os substratos foram submetidos a fervura em água de torneira nos tempos de: 5, 10 e 20 min ou sem ferver. Em seguida cada substrato, segundo seu tempo de fervura, foi distribuído em 16 frascos de vidros de 500 cm<sup>3</sup> com 200 g de substrato em cada recipiente e sub-divididos em quatro tratamentos com quatro repetições, sendo cada tratamento composto do seu substrato e pela adição de 10 cm<sup>3</sup> de BD (batata + dextrose) esterilizado ou água de torneira antes de ser autoclavado e mais 10 cm<sup>3</sup> de BD ou água de torneira não esterilizada no momento da inoculação do fungo ficando os tratamentos distribuídos segundo a adição de BD ou água antes e após autoclavados: Tratamento um (T1), (BD + BD); Tratamento dois (T2), (BD + água); Tratamento três (T3), (água + BD) e Tratamento quatro (T4), (água + água).

Após todos os recipientes receberem os substratos e tratamentos com BD e água, foram fechados com papel alumínio e tinalizados em autoclave a 121 °C por 25 min e em seguida em câmara de fluxo laminar foi adicionado o conteúdo de uma placa de Petri (100X15MM) com meio totalmente colonizado pelo isolado. Após a inoculação, os recipientes foram incubados a 25 °C por sete dias com fotoperíodo de 12 h.

Para avaliar o efeito dos substratos e tratamentos, foi verificada a concentração e viabilidade dos esporos em cada recipiente. A concentração foi determinada diluindo-se 50 g do substrato + inóculo em 1 litro de água de todos os recipientes e verificada através de câmara de Neubauer. A viabilidade dos esporos foi determinada adicionando-se 0,3 cm<sup>3</sup> da solução obtida na avaliação da concentração em placas de Petri (40 x 10 mm) com AA (ágar+água) com 4 placas por repetição de cada tratamento e em seguida incubadas a 25 °C no escuro por 12 h. Na seqüência foram contados os primeiros 25 esporos de cada placa, totalizando 100 esporos por repetição de cada tratamento e, considerando viáveis aqueles em que a hifa foi maior que o diâmetro do esporo. Estes dados foram transformados em índices pelo produto entre 10<sup>6</sup> conídios por cm<sup>3</sup> X % de germinação.

Para os testes de armazenamento, o inóculo foi produzido em substrato de sorgo e trigo, considerando que estes foram os melhores nos testes de concentração e germinação feitos anteriormente. Estes substratos foram fervidos por 10 min adicionando-se somente água esterilizada ao substrato. Em seguida selecionou-se o inóculo produzido em substrato de sorgo que apresentou maior concentração de conídios, o qual foi homogeneizado e distribuído 100 g de inóculo em recipientes de vidros de 250 cm<sup>3</sup> e separados em seis amostras com 4 repetições e posteriormente armazenadas nas condições de temperatura ambiente (prateleira), freezer (-4 °C), geladeira (4 °C), BOD a 15, 25 e 35 °C.

As concentrações e viabilidade do inóculo foram avaliadas no primeiro dia antes do início do armazenamento e após 30, 60 e 90 dias diluindo-se 5 g de inóculo + substrato de cada repetição em 100 cm<sup>3</sup> de água e observada sob microscópio utilizando uma câmara de Neubauer, sendo os dados representados em 10<sup>6</sup> conídios por cm<sup>3</sup>.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa de estatística SAS<sup>®</sup> e em caso de significância dos tratamentos aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias. Os dados de concentração do inóculo produzido foram transformados em raiz quadrada (x+1) e os índices em log (x+1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância revelou que houve efeito significativo da interação entre substratos, tratamentos e tempos de fervura do processo de produção do inóculo e também da interação entre os ambientes e o tempo de armazenagem do inóculo. Isto indica a necessidade de análise de todas as variáveis.

A análise dos dados de concentração do inóculo (Tabela 1), durante o processo de produção para os diferentes tratamentos de cada substrato não evidenciou diferenças significativas, ao contrário da análise entre os diferentes tempos de fervura a que os substratos foram submetidos. O melhor resultado foi obtido no substrato de arroz, no tratamento 2, fervido por 20 min. Foram observadas várias diferenças de concentração do fungo em substratos fervidos por tempos diferentes como é o caso do trigo em que o tratamento 4 fervido por 20 min foi inferior aos fervidos por 5 e 10 min. Denota-se que a maior interferência ocorrida nos tratamentos não estão entre eles no mesmo substrato, mas sim sobre os diferentes substratos e tempos de fervura. Considerando os valores absolutos, as duas melhores concentrações ocorreram no tratamento 4 em trigo fervido por 5 e 10 min com 1,36 e 1,46 x 10<sup>6</sup> conídios por cm<sup>3</sup> respectivamente e os piores ocorreram nos tratamentos 1 e 2 na casca de arroz e fervidos por 20 min com 0,017 e 0,012 x 10<sup>6</sup> conídios por cm<sup>3</sup> respectivamente.

TABELA 1 – Concentração de 10<sup>6</sup> conídios de *Trichothecium roseum* por cm<sup>3</sup> produzidos em diferentes substratos e submetidos a tratamentos com BD (batata + dextrose) ou água e fervidos em tempos diferentes.

Substratos	Tratamentos *	Tempo de fervura dos substratos (min)											
		zero			5			10			20		
ARROZ	1	0,2050	A a	(a)	0,0225	A a	(a)	1,0825	A a	(a)	0,3175	A a	(a)
	2	0,2400	A ab	(a)	0,0325	A b	(a)	0,3125	A ab	(a)	1,3475	A a	(a)
	3	0,0175	A a	(a)	0,0525	A a	(a)	0,4750	A a	(a)	0,3850	A a	(a)
	4	0,8100	A a	(a)	0,1500	A a	(b)	1,2700	A a	(a)	0,2600	A a	(a)
CASCA	1	0,1950	A a	(a)	0,1300	A a	(a)	0,0575	A a	(a)	0,0175	A a	(a)
	2	0,0500	A a	(a)	0,0925	A a	(a)	0,0575	A a	(a)	0,0125	A a	(b)
	3	0,1050	A a	(a)	0,0475	A a	(a)	0,0550	A a	(a)	0,0500	A a	(a)
	4	0,0875	A a	(a)	0,1200	A a	(b)	0,0525	A a	(b)	0,0750	A a	(a)
SORGO	1	0,3625	A a	(a)	0,4075	A a	(a)	1,1050	A a	(a)	0,1750	A a	(a)
	2	0,0950	A a	(a)	0,4275	A a	(a)	0,8850	A a	(a)	0,6100	A a	(ab)
	3	0,6075	A a	(a)	0,0975	A a	(a)	0,7975	A a	(a)	0,8275	A a	(a)
	4	0,2000	A a	(a)	0,1325	A a	(b)	0,6900	A a	(ab)	0,3025	A a	(a)
TRIGO	1	0,0600	A a	(a)	0,6900	A a	(a)	0,5350	A a	(a)	0,0250	A a	(a)
	2	0,0275	A a	(a)	0,7075	A a	(a)	0,3000	A a	(a)	0,0375	A a	(b)
	3	0,1000	A a	(a)	0,9900	A a	(a)	0,4550	A a	(a)	0,0675	A a	(a)
	4	0,0375	A b	(a)	1,3600	A a	(a)	1,4625	A a	(a)	0,1200	A b	(a)

Letras maiúsculas comparam médias de tratamentos dentro de cada substrato e tempo de fervura. Letras minúsculas comparam médias entre tempos de fervura dentro de cada tratamento e substrato. Letras entre parênteses comparam as médias de tratamentos dentro de cada tempo entre os substratos. \* Tratamentos: 1= (BD+BD), 2= (BD+ÁGUA), 3= (ÁGUA+BD), 4= (ÁGUA+ÁGUA). Dados representados na escala original e transformados em raiz (X+1). Dados seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estes dados indicam, que os substratos mais resistentes como o arroz integral e o sorgo, quando submetidos a um tempo maior de fervura, antes da inoculação melhoram a concentração de conídios. Da mesma forma, aqueles que se desintegram mais facilmente como é o caso do trigo, não podem ser fervidos por muito tempo, pois resultam na redução da concentração de conídios. A provável causa destas ocorrências pode estar relacionada ao grau de firmeza do substrato o qual dificulta a fixação e retirada de nutrientes pelo fungo quando não fervidos ou, a redução dos níveis de oxigênio nos substratos menos resistentes e fervidos por mais tempo, uma vez que, a presença de oxigênio e a disponibilidade de nutrientes são fatores importantes para a sobrevivência dos fungos (Raven et al., 2001; Cheida, 2002).

Quanto a germinação de conídios durante o processo de produção do inóculo (Tabela 2), constatou-se que apenas no substrato arroz houve

diferença significativa entre os tratamentos sendo que o tratamento 4 o qual recebeu somente água durante o processo, quando fervido por 5 min foi superior aos demais tratamentos. Para os diferentes tempos de fervura de cada tratamento por substrato verificou-se que no substrato de arroz houve diferença significativa quando fervido por 5 min para os tratamentos 1, 2, e 3. Para o substrato casca de arroz o tratamento 1 quando não fervido e fervido por 5 min foi superior aos fervidos por 5 e 20 min, enquanto que para os tratamentos 2, 3 e 4 quando não fervidos foram sempre superiores aos fervidos por 5 e 20 min. Assim, o melhor desempenho dos tratamentos neste substrato foi quando não fervidos e fervidos por 10 min. O substrato trigo fervido por 20 min apresentou diferença entre os demais tratamentos. Os tratamentos em substrato de sorgo, não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tempos de fervura dos mesmos.

TABELA 2 – Percentagem de germinação de conídios de *Trichothecium roseum* produzidos em diferentes substratos e adicionados de BD (batata + dextrose) ou água e fervidos em diferentes tempos.

Substratos	Tratamentos *	Tempo de fervura dos substratos (min)															
		zero			5			10			20						
ARROZ	1	95,0	A	a	(a)	22,0	B	b	(b)	85,0	A	a	(a)	83,5	A	a	(ab)
	2	69,5	A	a	(a)	20,8	B	b	(b)	85,8	A	a	(ab)	70,3	A	a	(a)
	3	81,3	A	a	(a)	28,5	B	b	(b)	62,8	A	ab	(ab)	64,5	A	ab	(ab)
	4	93,8	A	a	(a)	87,0	A	ab	(a)	54,0	A	b	(b)	57,3	A	ab	(ab)
CASCA	1	89,0	A	a	(a)	50,0	A	bc	(b)	62,3	A	ab	(a)	14,5	A	c	(c)
	2	84,0	A	a	(a)	23,0	A	b	(b)	50,3	A	ab	(b)	21,8	A	b	(b)
	3	79,5	A	a	(a)	33,5	A	b	(b)	47,3	A	ab	(b)	11,8	A	b	(b)
	4	84,3	A	a	(a)	40,8	A	b	(b)	54,0	A	ab	(b)	30,8	A	b	(b)
SORGO	1	96,0	A	a	(a)	97,3	A	a	(a)	96,8	A	a	(a)	92,0	A	a	(a)
	2	94,0	A	a	(a)	89,3	A	a	(a)	98,3	A	a	(a)	86,0	A	a	(a)
	3	95,8	A	a	(a)	76,5	A	a	(a)	97,3	A	a	(a)	89,3	A	a	(a)
	4	96,5	A	a	(a)	91,3	A	a	(a)	97,5	A	a	(a)	83,8	A	a	(a)
TRIGO	1	85,5	A	ab	(a)	93,5	A	a	(a)	96,0	A	a	(a)	53,8	A	b	(b)
	2	80,5	A	ab	(a)	88,3	A	ab	(a)	96,5	A	a	(a)	58,0	A	b	(ab)
	3	85,8	A	a	(a)	87,0	A	a	(a)	96,5	A	a	(a)	44,0	A	b	(b)
	4	80,3	A	a	(a)	80,3	A	a	(a)	98,8	A	a	(a)	39,5	A	b	(b)

Letras maiúsculas comparam médias de tratamentos dentro de cada substrato e tempo de fervura. Letras minúsculas comparam médias entre tempos de fervura dentro de cada tratamento e substrato. Letras entre parênteses comparam as médias de tratamentos dentro de cada tempo entre os substratos. \* Tratamentos: 1= (BD+BD), 2= (BD+ÁGUA), 3= (ÁGUA+BD), 4= (ÁGUA+ÁGUA). Dados representados na escala original e não transformados. Dados seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados de germinação do inóculo para cada tratamento comparado aos diferentes substratos (Tabela 2) demonstraram que nenhum dos tratamentos diferiu entre si quando não fervidos. Quando fervidos por 5 min, o sorgo e trigo foram superiores ao arroz e casca de arroz para os tratamentos 1, 2 e 3. Quando fervidos por 10 min, os tratamentos 2 e 3 foram superiores para o sorgo e trigo em relação à casca de arroz. Nos substratos fervidos por 20 min o tratamento 1 em sorgo foi superior ao de arroz e trigo, o 2 em arroz e trigo superior a casca de arroz, o 3 e 4 em sorgo foram superiores aos de casca de arroz e trigo (Tabela 2). Observando-se o conjunto de dados com as respectivas diferenças ocorridas observa-se que os piores desempenhos na germinação dos conídios ocorreram no substrato de casca de arroz fervida por 5, 10 e 20 min, o arroz fervido por 5 min e o trigo fervido por 20 min.

Estes resultados de germinação dos conídios podem ser explicados pelas mesmas razões dos resultados obtidos nos testes de concentração do fungo no qual observa-se variabilidade segundo o tipo de substrato e os tempos de fervura dos mesmos, reafirmando que a fervura dos substratos contribui para um melhor ou pior desempenho do inóculo tanto na produção quanto na germinação de conídios. Resultados semelhantes com o uso de substratos de trigo e sorgo na produção de inóculos foram obtidos por Leoni & Ghini (2003) e Costa & Costa (2004).

Os índices obtidos pelo produto entre

conídios  $\times 10^6$  por  $\text{cm}^3$  e % de germinação do fungo (Tabela 3) indicaram que para os tratamentos dos substratos não fervidos apenas o 3 em substrato de arroz foi significativamente inferior ao tratamento 4. Para os tratamentos nos demais substratos e diferentes tempos de fervuras, não houve diferença estatística entre os mesmos. Os resultados obtidos para cada tratamento em cada substrato para os diferentes tempos de fervura demonstraram diferenças significativas para os substratos de arroz e trigo sendo que no arroz os tratamentos 1 e 2 fervidos por 5 min foram inferiores aos fervidos por 10 e 20 min e no substrato com trigo todos os tratamentos fervidos por 20 min e os tratamentos 2 e 4 não fervidos foram inferiores aos fervidos por 5 e 10 min exceto para o tratamento 2 fervido por 10 min. Os dados de cada tratamento nos diferentes substratos revelaram que o tratamento 1 quando fervido por 5 min no arroz foi inferior ao sorgo e trigo, quando fervido por 10 min na casca de arroz. O tratamento 2 no arroz foi inferior ao sorgo e trigo e na casca de arroz inferior ao trigo quando fervido por 5 min, na casca de arroz foi inferior ao sorgo quando fervido por 10 min e ao arroz e sorgo quando fervido por 20 min. O tratamento 3 no arroz foi inferior ao sorgo quando não fervido, no trigo foi superior aos demais no tempo de 5 min de fervura e na casca de arroz inferior ao sorgo fervido por 10 min e ao arroz e sorgo fervidos por 20 min. O tratamento 4 na casca de arroz foi inferior ao trigo nos tempos de 5 e 10 min de fervura (Tabela 3).

TABELA 3 – Índices (conídios  $\times 10^6$  por  $\text{cm}^3$   $\times$  % germinação) obtidos na produção de *Trichothecium roseum* nos diferentes substratos, tempos de fervura e tratamentos utilizados.

Substratos	Tratamentos *	Tempo de fervura dos substratos (min)															
		zero			5			10			20						
ARROZ	1	19,73	AB	ab	(a)	0,88	A	b	(b)	91,31	A	a	(a)	26,68	A	a	(a)
	2	9,79	AB	ab	(a)	0,62	A	b	(c)	25,18	A	a	(ab)	105,51	A	a	(a)
	3	1,45	B	a	(b)	1,31	A	a	(b)	31,07	A	a	(ab)	24,20	A	a	(a)
	4	75,77	A	a	(a)	12,95	A	a	(ab)	74,60	A	a	(ab)	12,58	A	a	(a)
CASCA	1	17,44	A	a	(a)	6,09	A	a	(ab)	4,17	A	a	(b)	0,39	A	a	(b)
	2	4,28	A	a	(a)	2,20	A	a	(bc)	3,01	A	a	(b)	0,27	A	a	(b)
	3	8,34	A	a	(ab)	1,66	A	a	(b)	2,43	A	a	(b)	0,78	A	a	(b)
	4	7,39	A	a	(a)	4,77	A	a	(b)	2,82	A	a	(b)	2,44	A	a	(a)
SORGO	1	34,89	A	a	(a)	39,48	A	a	(a)	106,01	A	a	(a)	16,10	A	a	(ab)
	2	9,10	A	a	(a)	40,58	A	a	(ab)	86,37	A	a	(a)	57,69	A	a	(a)
	3	58,44	A	a	(a)	7,78	A	a	(b)	77,17	A	a	(a)	79,11	A	a	(a)
	4	19,75	A	a	(a)	12,79	A	a	(ab)	66,35	A	a	(ab)	26,01	A	a	(a)
TRIGO	1	5,27	A	ab	(a)	63,89	A	a	(a)	51,08	A	a	(a)	1,38	A	b	(b)
	2	2,33	A	b	(a)	61,82	A	a	(a)	29,16	A	ab	(ab)	2,18	A	b	(b)
	3	8,56	A	ab	(ab)	86,11	A	a	(a)	43,79	A	a	(ab)	3,20	A	b	(ab)
	4	3,08	A	b	(a)	106,83	A	a	(a)	144,77	A	a	(a)	4,66	A	b	(a)

Letras maiúsculas comparam médias de tratamentos dentro de cada substrato e tempo de fervura. Letras minúsculas comparam médias entre tempos de fervura dentro de cada tratamento e substrato. Letras entre parênteses comparam as médias de tratamentos dentro de cada tempo entre os substratos. \* Tratamentos: 1= (BD+BD), 2= (BD+ÁGUA), 3= (ÁGUA+BD), 4= (ÁGUA+ÁGUA). Dados representados na escala original e transformados em Log (X+1). Dados seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Da mesma forma que na germinação o substrato que no conjunto apresentou maior variabilidade quando comparado cada tratamento para os diferentes substratos e tempos de fervura foi a casca de arroz fervida por 5, 10 e 20 min, o arroz fervido por 5 min e o trigo fervido por 20 min. Da análise de cada tratamento dentro do mesmo substrato e por tempo de fervura, o trigo fervido por 20 min apresentou no conjunto os piores resultados.

A interpretação destes dados revela que para muitos casos nos quais houve baixa concentração de conídio houve também baixas taxas de germinação resultando em índices bastante reduzidos a exemplo do substrato de casca de arroz. Por esta razão há necessidade de se testar diferentes tipos de substratos a fim de se encontrar a melhor forma de produção de inóculo para um fungo específico.

Quanto as diferenças encontradas entre alguns tratamentos no mesmo substrato e tempo de fervura (Tabelas 1, 2 e 3), isto, pode estar relacionado a adição de BD (batata + dextrose) sendo que isto visou avaliar a capacidade dos conídios em esporular em meio pobre. Constatou-se pelo índice (Tabela 3) que em nenhum momento o tratamento 4 ao qual não foi adicionado BD (batata + dextrose), apresentou-se inferior aos demais nos diferentes substratos e tempos de fervura confirmando sua capacidade em esporular em meio com pouco nutriente. Este fator é importante para a redução no custo de produção e a continuidade do fungo no ambiente natural. Resultados semelhantes foram obtidos por Costa & Costa (2004) que conseguiram produzir inóculo de

*F. solani* em substrato de sorgo autoclavado com 60 cm<sup>3</sup> de água para cada 100 g de semente. Da mesma forma, Leoni & Ghini (2003) obtiveram boa produção de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, em sementes de trigo autoclavadas somente com água estéril.

Considerando-se os resultados positivos obtidos por Moreira (2005) e Negri (2007) utilizando *T. roseum* na concentração de 10<sup>6</sup> conídios por cm<sup>3</sup> para o controle de *M. fructicola* em pêssego e considerando as melhores concentrações obtidas neste experimento, exceto para a casca de arroz que foi muito baixa, seria necessário 370 g de inóculo com arroz, 450 g com sorgo e 342 g com trigo para o preparo de 100 dm<sup>3</sup> de suspensão, o que significa a possibilidade do preparo de grande quantidade de suspensão com pequenas quantidades de inóculo, fator importante sob o aspecto prático e econômico.

Nos testes de armazenagem do inóculo nos diversos ambientes com temperaturas diferentes (Tabela 4) constatou-se redução significativa na concentração de conídios após 60 dias de armazenagem para os ambientes com 25 e 35 °C sendo que, a 25 °C diferiu sobre os locais com temperatura ambiente e 25 °C. O ambiente com 35 °C diferiu sobre todos os demais exceto ao de 25 °C. Aos 90 dias houve redução significativa dos ambientes com 25 e 35 °C sobre os locais com temperatura ambiente, a -4 e 4 °C. Na análise sobre o tempo de armazenagem houve redução significativa da concentração para o ambiente com 35 °C aos 60 e 90 dias com reduções de 28 e 34%, respectivamente, em relação ao tempo inicial.

TABELA 4 – Concentração e germinação do fungo *Trichothecium roseum* produzido em substrato de sorgo e armazenado durante 90 dias em seis locais com temperaturas diferentes.

Locais (°C)	Concentração (conídios x 10 <sup>6</sup> )				Germinação (%)			
	Inicial	30 dias	60 dias	90 dias	Inicial	30 dias	60 dias	90 dias
-4	2,50 A a	2,50 A a	2,52 AB a	2,78 A a	89,25 A a	74,00 A a	43,60 A b	32,00 A b
4	2,50 A a	2,34 A a	2,61 A a	2,73 A a	89,25 A a	29,00 B b	12,00 B c	5,00 B d
15	2,50 A a	2,29 A a	2,44 AB a	2,28 AB a	89,25 A a	7,31 D b	0,75 C c	0,00 C d
25	2,50 A a	2,20 A a	2,08 BC a	2,00 B a	89,25 A a	2,33 E b	0,00 D c	0,00 C c
35	2,50 A a	2,23 A ab	1,79 C bc	1,65 B c	89,25 A a	1,66 E b	0,00 D c	0,00 C c
Ambiente	2,50 A a	2,69 A a	2,65 A a	2,55 A a	89,25 A a	15,00 C b	0,00 D c	0,00 C c

Letras em maiúsculo representam análise vertical entre os locais de armazenagem e para cada período. Letras em minúsculo representam análise horizontal considerando o tempo de armazenagem em cada ambiente. Os dados seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados originais não transformados.

Os dados de germinação de conídios (Tabela 4) armazenados nos diversos ambientes determinaram que houve redução significativa após 30 dias em todos os ambientes em relação ao de temperatura -4 °C a qual, passou a ser significativa a partir dos 60 dias de armazenagem. As maiores reduções na germinação aos 30 dias de armazenagem ocorreram para os ambientes com temperaturas de 25 e 35 °C cujas reduções foram de 97 e 98%, respectivamente, em relação ao tempo inicial. A germinação dos conídios deixou de ocorrer nas temperaturas de 25 e 35 °C e

temperatura ambiente a partir de 60 dias e a 15 °C a partir dos 90 dias de armazenagem. Quanto ao período de armazenagem a redução na germinação de conídios passou a ser significativa na temperatura de -4 °C aos 60 dias enquanto que, nas demais temperaturas esta ocorrência se deu aos 30 dias de armazenagem. No ambiente com temperatura de -4 °C a germinação foi de 74, 44 e 32% aos 30, 60 e 90 dias respectivamente, sendo estes resultados significativamente superiores aos demais.

A redução da concentração e germinação de

conídios para o noculo armazenado em temperaturas mais elevadas pode estar associada à desidratação dos conídios em função da perda de umidade nestas temperaturas e/ou à continuidade do metabolismo do fungo limitando a disponibilidade de nutrientes por competição ao longo do tempo. A temperatura e umidade são fatores importantes no desenvolvimento de fungos (Raven et al., 2001; Bleicher, 1997; Ryan & Ellison, 2003). Um trabalho para avaliar a influência da temperatura no crescimento micelial de *T. roseum* demonstrou que as temperaturas ótima, máxima e mínima para o crescimento de fungo foi de 20 a 25 °C, de 36 °C e de 4,9 °C respectivamente (Moreira, 2005). Estes resultados confirmam a continuidade metabólica do fungo nas temperaturas entre 5 e 36 °C, justificando a menor competição por nutrientes nas temperaturas de 4 e -4 °C utilizadas neste trabalho.

Trabalho semelhante foi realizado por Zambenedetti et al. (2007) que avaliaram a germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd, e P. Syd. Em diferentes métodos de armazenamento, nos quais, foi observada reduções significativas na germinação para ambientes com temperaturas mais elevadas.

As temperaturas utilizadas para o armazenamento do noculo neste experimento justifica-se por estas poderem ser conseguidas facilmente nas propriedades como é o caso de freezer (-4 °C), geladeira (4 °C) e temperatura ambiente, nas quais verificou-se bons resultados de

conservação do noculo. Trabalho semelhante, com bons resultados nas temperaturas ambiente, 4 °C e 22 °C foi realizado na produção de *Penicillium frequentans* Westling, em diferentes formulações e armazenado durante um ano (Guijarro et al., 2007). Há de se considerar ainda que a conservação de inóculo nestas temperaturas requer baixo custo de equipamento e conseqüentemente baixo capital de investimento. De acordo com Castilho et al. (2000) estes fatores são importantes para a produção em alta escala de um antagonista.

## CONCLUSÕES

1) O arroz, sorgo e trigo, podem ser recomendados como substratos para produção de noculo de *Trichothecium roseum*, não havendo necessidade de adição de nutrientes.

2) Os tempos de fervura dos substratos interferem na produção do noculo de *T. roseum* conforme o tipo de substrato utilizado.

3) O ambiente mantido a uma temperatura de -4 °C foi o melhor para a conservação do noculo de *T. roseum* para um período de 90 dias.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná (UFPR), a Escola Agrotécnica Federal de Rio do Sul, SC, a EPAGRI, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, pela cooperação e contribuições para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- BETTIOL, W. Seleção de microorganismos antagonísticos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: CNPMA/EMBRAPA, 1991. p. 223-236.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Métodos alternativos usados com sucesso no Brasil para o controle de doenças de plantas. In: STADNICK, J. M., TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC. 2004. p. 143-157.
- BLEICHER, J. Doenças de rosáceas de caroço. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. p. 621-627.
- CASTILHO, L. R. et al. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.
- CHEIDA, L. E. **Biologia Integrada**. São Paulo: FTD, 2002. v. 2. 352 p.
- COSTA, G. R.; COSTA, J. L da S. Influência da densidade de inoculo de *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* na severidade da podridão radicular seca do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n. 2, p. 89-92, 2004.
- GUIJARRO, B. et al. Effects of different biological formulations of *Penicillium frequentans* on brown rot of peaches. **Biological Control**, v. 42, n. 1, p. 86-96, 2007.
- HONG, C. X.; MICHAILIDES, T. J. Prune, plum, and nectarine as hosts of *Trichothecium roseum* in California orchards. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 112, 1997.
- LARENA I.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P. Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 161-167, 2004.
- LEONI, C.; GHINI, R. Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 67-75, 2003.
- MOREIRA, L. M. **Controle químico e biológico de *Monilinia fructicola* (Wint) Honey e monitoramento de infecções latentes em frutos**. 1999. 76 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MOREIRA, L. M. **Alternativas de controle integrado da podridão parda do pessegueiro**. 2005. 113 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MOREIRA, L. M. et al. Controle em pós-colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 395-398, 2002.
- NEGRI, G. **Controle da podridão parda em pessegueiro conduzido em sistema orgânico e produção do antagonista *Trichothecium roseum***. 2007. 131 p. Tese (Doutorado em produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2001. 906 p.

NEGRI, G. et al. Produção e armazenamento de *Trichothecium roseum*...

15. RYAN, M.J.; ELLISON, C.A. Development of a cryopreservation protocol for the microcyclic rust-fungus *Puccinia spegazzinii*. **CryoLetters**, v. 24, n. 1, p. 43-48, 2003.
16. STADNICK, J. M.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. 293 p
17. VICCINI, G. et al. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. **Process biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 275-278, 2007.
18. ZAMBENEDETTI, E. B. et al. Germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em diferentes métodos de Armazenamento. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 83-85, 2007.

Recebido em 11/07/2008

Aceito em 01/02/2010