

Otimização do método de produção massal de *Trichoderma asperellum* (Ascomycota: Hypocreaceae) em arroz

Optimization of the mass production method of *Trichoderma asperellum* (Ascomycota: Hypocreaceae) in rice

Jorge González **AGUILERA**^{1,5}; Jean Carlos de Souza **SANTOS**²; Carolina Sousa Oliveira **SANTOS**²; Alan Mario **ZUFFO**¹; Rogerio **VIAN**²; Ícaro Raoni Ecke **MEDEIROS**²; Alexandre **BARBOSA**²; Roberto Balbino da **SILVA**³ & Janaina Tauil **BERNARDO**⁴

RESUMO

Produtos à base de *Trichoderma* spp. são amplamente utilizados no controle de doenças de solo. O objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito de dois métodos de umedecimento do arroz (M1 e M2), duas posições distintas de acondicionamento dos sacos na sala de crescimento, e quatro diferentes áreas de fita microporosa como parte do processo de otimização da produção de *Trichoderma asperellum*. O delineamento adotado foi fatorial (2 x 2 x 4) com três repetições. Inicialmente foi ajustada a quantidade de água a ser empregada no método M2, sendo testados os volumes de 0, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 ml e, posteriormente, estes foram avaliados por meio de duas escalas de notas, uma para o desenvolvimento de micélio e outra para a esporulação. Estimaram-se também as variáveis peso do arroz colonizado (PAC) e unidades formadoras de colônias (UFC) em dois experimentos, para ambos os métodos. Ao variar a quantidade de água no saco, concluiu-se que o fungo é dependente de uma maior porcentagem de umidade no substrato, com diferenças significativas ($P < 0.05$). Ao analisar a Anova, constataram-se diferenças altamente significativas ($P < 0.01$) para as interações duplas e triplas entre os fatores testados. O método M2 permitiu uma maior economia de tempo, proporcionando também valores superiores para PAC e UFC, combinados com a posição horizontal e com uma área de fita microporosa de 20 cm². Tal combinação promoveu o maior desenvolvimento do fungo *T. asperellum* nas condições testadas.

Palavras-chave: controle biológico; *on farm*; sala de crescimento; *Trichoderma* sp.; UFC.

ABSTRACT

Products based on *Trichoderma* spp. are widely used in the control of soil diseases. The objective of this work was to determine the effect of two methods of wetting the rice (M1 and M2), two different bag packing positions in the growth room, and four different areas of microporous tape as part of the production optimization process of *Trichoderma asperellum*. The adopted design was factorial (2 x 2 x 4) with three repetitions. Initially, the amount of water to be used in the M2 method was adjusted, and the volumes of 0, 80, 100, 120, 140, 160 and 180 ml were tested, and, then, those were evaluated by means of two note scales, one for the development of mycelium and the other for sporulation. The variables colonized rice weight (CRW) and colony forming units (CFU) were also evaluated in two experiments, for both methods. By varying the amount of water in the bag, it is concluded that the fungus is dependent on a higher percentage of moisture in the substrate, with significant differences

Recebido em: 8 mar. 2019

Aceito em: 13 jul. 2020

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) — Campus Chapadão do Sul, Rodovia MS 306, km 105, Caixa Postal 112 — CEP 79560-000, Chapadão do Sul, MS, Brasil.

² Núcleo de Produção de Insumo Orgânico na Propriedade para uso próprio sem fins de comercialização, Fazenda Selia, GO, Brasil.

³ Universidade Federal de Paraíba (UFPB), Campus Mamanguape, PB, Brasil.

⁴ Universidade Estadual de Rio Grande do Sul (UERGS), Cachoeira do Sul, RS, Brasil.

⁵ Autor para correspondência: j51173@yahoo.com.

($P < 0.05$). When analyzing the ANOVA, highly significant differences were noticed ($P < 0.01$) for the double and triple interactions between the tested factors. The M2 method allowed a greater time saving, also providing superior values for CRW and CFU, combined with the horizontal position and with a 20 cm² microporous tape area. This combination promoted the further development of *T. asperellum* fungus under the conditions tested.

Keywords: biological control; CFU; growth room; *on farm*; *Trichoderma* sp.

INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda por alimentos, o cultivo de espécies vegetais de forma sustentável tem aumentado expressivamente e vem se mostrando uma alternativa para redução dos danos ao ecossistema, aumento do lucro para os agricultores, além de proporcionar alimentos mais saudáveis (FAO, 2016). Quando se fala de agricultura sustentável, podem ser englobados aspectos relacionados à conservação dos recursos naturais e ao uso de métodos mais adequados para o plantio, tais como o emprego de biofertilizantes, plantas de cobertura, genótipos mais adaptados à ação de fatores bióticos e abióticos, bem como a utilização de fontes alternativas para o controle de insetos e patógenos (BETTIOL & MORANDI, 2009; EMBRAPA, 2012; BERNARDO *et al.*, 2019).

Nesse contexto, o uso de espécies de fungos responsáveis por controlar biologicamente inúmeras pragas e doenças tem possibilitado grandes ganhos à agricultura, sendo vários os casos de sucesso citados na literatura, como o relatado para *Beauveria bassiana* (NEVES *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2018), *Metarhizium anisopliae* (GARCIA *et al.*, 2006; GROTH *et al.*, 2017), *Isaria* sp. (LORENCETTI *et al.*, 2018), entre outros.

Dentre estes, os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, com 254 espécies descritas (BISSET *et al.*, 2015), compreendem um grupo de microrganismos de grande importância no que se refere aos micopesticidas. Diversos trabalhos já relataram sua ação na redução dos níveis de nematoides no solo (SAHEBANI & HADAVI, 2008; JINDAPUNNAPAT *et al.*, 2013; AL-HAZMI & TARIQJAVEED, 2016), no controle de fungos fitopatogênicos (CARVALHO *et al.*, 2015; MILAN *et al.*, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2016; MESQUITA *et al.*, 2017), além de atuarem como promotores de crescimento de plantas (DABIRE *et al.*, 2016; CARVALHO FILHO *et al.*, 2018; ROESE *et al.*, 2017).

Na literatura também podem ser encontrados relatos descrevendo o processo de multiplicação desses fungos. Segundo Bettiol & Morandi (2009), normalmente para a multiplicação *in vitro* de fungos são adotadas as técnicas de fermentação sólida ou semissólida e o processo bifásico, que envolve tanto a fermentação líquida como a sólida. Conforme os mesmos autores, a produção a partir da fermentação sólida, cuja base é o uso de cereais ou grãos pré-cozidos como substrato, consiste em uma técnica simples, pouco automatizada, mas de boa eficiência.

Embora diversos sejam os casos de sucesso na utilização de *Trichoderma* sp. como agente de biocontrole na agricultura (CARVALHO *et al.*, 2015; AL-HAZMI & TARIQJAVEED, 2016; MESQUITA *et al.*, 2017; HANADA & COSTA, 2018) e das técnicas de multiplicação e suas variações, ainda permanecem escassos os relatos desses procedimentos na literatura, sob condições “*on farm*” (BERNARDO *et al.*, 2019).

Partindo das limitações de tempo e trabalho operacional encontradas nos métodos de multiplicação descritos, o presente trabalho teve como objetivos determinar a melhor forma de multiplicação “*on farm*” de *Trichoderma asperellum* ao comparar dois diferentes métodos de umedecimento de arroz, verificar a melhor posição de colocação dos sacos na sala de crescimento, assim como determinar a melhor área da fita microporosa a ser disposta nos sacos para oxigenação na parte interna destes.

MATERIAL E MÉTODOS

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Conduziram-se os experimentos no laboratório pertencente à Fazenda Sélia, situada no município de Mineiros, Goiás. O ensaio foi completamente aleatorizado em esquema fatorial, e

avaliaram-se os seguintes parâmetros: i) dois métodos, arroz lavado seguido de um período imerso em água e arroz apenas com adição de água; ii) duas posições ou formas de colocar os sacos nas estantes da sala de crescimento, deitados (horizontal) ou em pé (vertical); e iii) ausência ou presença de fita microporosa, com três diferentes áreas de entrada de oxigênio no interior dos sacos. A combinação dos fatores foi composta por 16 tratamentos com três repetições, e cada saco inoculado foi avaliado como uma unidade experimental.

OBTENÇÃO E USO DO INÓCULO

Como fonte de inóculo foi usado arroz colonizado pelo fungo na própria fazenda, obtido a partir do produto comercial da empresa Farroupilha®, fungicida microbiológico formulado à base de *Trichoderma asperellum*. Para o crescimento do fungo, o arroz inoculado permaneceu sob temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$, fotoperíodo de 12:12 (luz:escuro), de 30/5/2018 até 6/6/2018, sendo conservado posteriormente em geladeira a -4°C até o momento de ser utilizado. Antes de realizar a inoculação, uma diluição em água destilada foi adotada para verificar a concentração de conídios. ml^{-1} com auxílio da câmara de Neubauer e um microscópio ótico (aumento de 400x), sendo feitas duas leituras da mesma amostra, como descrito por Embrapa (2012); a concentração final do inóculo foi de 1.03×10^{10} conídios. ml^{-1} .

Para o preparo do inóculo, fez-se uma mistura de arroz colonizado com *T. asperellum* e água, na proporção de 1:1 (1 kg arroz:1 litro de água). Um volume de 10 ml de inóculo foi injetado em cada saco com auxílio de uma seringa, mantendo-se o inóculo sob agitação constante com auxílio de um agitador magnético, para evitar precipitação dos esporos.

SUBSTRATO EMPREGADO

Como substrato, usou-se arroz parboilizado tipo 1 da marca Tio Adal, adquirido no município de Mineiros, Goiás. Como embalagem, adotou-se saco de polietileno autolavável de 25 x 30 cm. O volume de arroz utilizado foi de 400 g por saco. Uma vez distribuído o arroz nos sacos, estes foram selados e autoclavados a 120°C por 20 min. Uma vez resfriados (12 a 24 horas), os sacos com o arroz foram transferidos para uma câmara de fluxo laminar para a inoculação; a câmara foi previamente esterilizada com solução de hipoclorito de sódio a 1% e etanol a 70%.

TRATAMENTOS TESTADOS

Foram testados dois métodos (método 1 – M1 / método 2 – M2), os quais diferiram na forma de manipulação do arroz antes de ser autoclavado. Avaliaram-se ainda as posições na disposição dos sacos (horizontal e vertical) nas estantes de crescimento, com três diferentes áreas (10, 20 e 30 cm^2) de fita microporosa (Missner®, com 5 cm de largura), colocada para melhorar o intercâmbio de gases no interior dos sacos.

O método M1 consistiu na retirada de impurezas do arroz, por meio de três lavagens consecutivas com água de torneira, seguida de um período de 30 minutos de umedecimento até que o arroz adquirisse uma textura que permitisse ser quebrado com a unha sem estalar. O tempo utilizado para umedecer o arroz foi previamente otimizado, pois pode sofrer variação de acordo com o tipo ou marca de arroz empregado. Após decorrido o tempo de umedecimento, o arroz foi escorrido para a retirada do excesso de água, período este de aproximadamente 20 min. Em seguida, o arroz foi ensacado, sendo colocados 400 g por saco; este foi fechado com o auxílio de uma seladora da marca Selamil Portátil (R.Baião) e autoclavado a 120°C por 20 min.

Para o método M2 não foram efetuadas lavagens, sendo acrescentada água após o ensacamento do arroz. Para 400 g de arroz, acrescentou-se um total de 180 ml de água destilada. A quantidade de água foi otimizada previamente, sendo testados os volumes de 0, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 ml por saco (experimento 1). Após efetuar a mistura no interior dos sacos, estes foram selados e autoclavados a 120°C por 20 min.

Dentre as fontes de variações experimentais propostas, testaram-se ainda duas outras de interesse para o grupo de pesquisa:

1) a posição dos sacos dispostos nas estantes da sala de crescimento, com finalidade de otimização de espaço, sendo avaliadas duas posições: horizontal, amplamente recomendada em vários protocolos descritos na literatura; e vertical, também descrita na literatura;

2) ausência (controle – sem fita microporosa) e colocação de fita microporosa com diferentes comprimentos, permitindo a cobertura de três diferentes áreas (2x5, 2x10 e 2x15 cm, com área de 10, 20 e 30 cm², respectivamente). Para a colocação da fita microporosa, fez-se inicialmente a marcação da área no saco de polipropileno, a 10 cm da base. O corte foi efetuado com o auxílio de uma tesoura, para a retirada da parte interna da área demarcada no saco, e posteriormente foi colocada a fita microporosa sobre a abertura, a fim de possibilitar a circulação de gases no interior dos sacos.

Realizaram-se dois experimentos de modo sequencial. No primeiro (experimento 2) foram empregados os tratamentos supradescritos sem nenhuma variação; no segundo (experimento 3) modificou-se apenas a quantidade de arroz após o processo de lavagem e umedecimento, citado por Bernardo *et al.* (2019), garantindo a mesma quantidade de arroz nos dois métodos testados, sendo, portanto, utilizados 500 g de arroz lavado e umedecido.

Após a autoclavagem, os tratamentos foram acondicionados em sala asséptica até o momento da inoculação. Depois de inoculados, os sacos foram vigorosamente agitados manualmente para distribuição uniforme do inóculo no substrato e, então, dispostos em estantes em sala de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro). Nos dois primeiros dias, em todos os tratamentos, os sacos permaneceram sob ausência total de luz; posteriormente foi aplicado fotoperíodo de 12:12 até o término do experimento. Decorridos os primeiros dois dias, efetuou-se uma agitação em cada um dos sacos de modo intercalado (dia sim, dia não).

VARIÁVEIS AVALIADAS

Uma escala de notas foi criada para avaliar o crescimento aparente do fungo no experimento 1, no segundo dia após a inoculação (DAI). Para a avaliação do crescimento micelial em relação à área coberta, adotaram-se as seguintes notas:

- 1) ausência total de micélio;
- 2) 1 até 25% da área coberta por micélio;
- 3) 26 até 50% da área coberta por micélio;
- 4) 51 até 75% da área coberta por micélio;
- 5) 76 até 100% da área coberta por micélio.

Do terceiro ao quinto DAI, uma segunda escala de notas foi adotada, levando em consideração a produção de conídios, sendo observada a coloração esverdeada dos pacotes como indicador de produção e área coberta, com a aplicação da seguinte escala de notas:

- 1) ausência total de conídios;
- 2) 1 até 25% da área coberta por conídios;
- 3) 26 até 50% da área coberta por conídios;
- 4) 51 até 75% da área coberta por conídios;
- 5) 76 até 100% da área coberta por conídios.

As avaliações ocorreram até o quinto DAI, pois se observou que o período ótimo era obtido em torno de 5 a 6 DAI. Acima dessa data, geralmente o crescimento e a esporulação do fungo ocorrem de forma mais lenta, podendo aumentar a incidência de problemas com contaminação.

Nos experimentos 2 e 3 analisou-se o peso final do arroz colonizado (PAC), subtraindo-se o peso do saco. Após o término dos experimentos, uma amostra de 10 g de cada repetição por tratamento foi coletada. Tais amostras foram acondicionadas em frascos Erlenmeyer, diluídas em 90 ml de H₂O + 0,01% de Tween 80® e agitadas por 20 minutos. As amostras foram diluídas sucessivamente e, em seguida, o número de conídios.ml⁻¹ (unidades formadoras de colônia – UFC) foi quantificado, utilizando uma câmara de Neubauer e um microscópio ótico (aumento de 400x). Realizou-se a contagem em dois campos e em cinco quadrantes da câmara. Esse procedimento foi feito em todas as amostras, seguindo o protocolo proposto pela Embrapa (2012).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das diferentes variáveis estudadas seguiu um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 4. Os dados de número de PAC e UFC foram analisados por meio da análise de variância (Anova). As médias foram comparadas pelo teste HSD de Tukey-Kramer e consideradas estatisticamente diferentes ao nível de significância de 5%. Os dados do experimento 2 foram submetidos à transformação raiz quadrada para PAC e UFC; no experimento 3 apenas a UFC precisou ser transformada. Em ambos os casos, as transformações foram realizadas para melhorar a homogeneidade das variâncias e para serem normalizadas antes da análise dos dados. Todas as análises de dados foram efetuadas pelo *software* SISVAR (FERREIRA, 2011). Sempre que ocorreram interações significativas, fizeram-se os desdobramentos das interações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos de multiplicação de fungos em condições “on farm” são conhecidos em todo o mundo, porém no Brasil, ainda que conhecida, essa metodologia de produção não é empregada pelos produtores (BERNARDO *et al.*, 2019). Partindo de outras experiências de sucesso, buscou-se seguir um protocolo que permitisse otimizar ao máximo a produção “on farm” e que possibilitasse um rápido crescimento do fungo e com qualidade. Para isso foram avaliados dois métodos diferentes de condução e preparação do substrato (arroz parboilizado). A necessidade de uma maior oxigenação por parte do fungo tem sido descrita por alguns autores (SANTOS *et al.*, 2009; MASCARIN & QUINTELA, 2013). Pensando nisso, utilizou-se fita microporosa nos sacos para favorecer a oxigenação, tendo sido necessário realizar ajustes no tamanho da fita; então foram testadas três diferentes medidas que permitissem avaliar seu efeito no crescimento e na esporulação do fungo, determinando o melhor tamanho a ser empregado e incluindo essas modificações no processo de produção “on farm”.

O experimento 1 consistiu na otimização do volume de água a ser colocado no saco para o método M2, pela referência que se tinha de usar um volume de água correspondendo a 40% do volume do substrato (tabela 1). Foram avaliadas sete quantidades diferentes de água destilada (0, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 ml, correspondendo a 0, 20, 25, 30, 35, 40 e 45% do volume de arroz empregado, respectivamente) para um volume de 400 g de substrato por saco. Os resultados desse teste mostraram que existem diferenças significativas entre os volumes de água testados ($P < 0,01$), sendo as maiores quantidades de água (120 a 180 ml) as que promoveram o melhor crescimento do fungo (figura 1). Para todas as datas avaliadas, os dados referentes à variável nota se ajustaram a uma equação exponencial com valores de $R^2 > 92$ com ajuste da %, evidenciando a relação direta existente entre o conteúdo de água e o desenvolvimento do fungo.

Tabela 1 – Resumo das análises de variância e comparação das médias do experimento 1 para o teste de sete diferentes quantidades de água (ml), adicionada ao substrato de arroz parboilizado empregado na produção de *Trichoderma asperellum*, em Mineiros, GO, em 2018. Legenda: FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; CV = coeficiente de variação.

FV	GL	Quadrados médios			
		2 DAI ¹	3 DAI	4 DAI	5 DAI
Blocos	2	0,0529	0,1905	0,0476	0,0476
Tratamento	6	2,4319**	8,7143**	8,0952**	8,0476**
Resíduo	12	0,0595	0,1905	0,2143	0,0476
Média		2,66	3,38	3,52	3,62
CV (%)		9,18	12,91	13,14	6,03

* diferenças estatísticas das médias pelo teste F a 1% de significância. ¹DAI = dias após a inoculação.

A ausência de água no primeiro tratamento não promoveu o crescimento do fungo (nota 1), do início ao final do período de avaliação (figura 1), mostrando a imprescindível necessidade de se manter um teor de umidade que favoreça o crescimento do fungo. As quantidades de 80 ml (20%) e 100 ml (25%) permitiram o crescimento do fungo em valores que não superaram os 25% de crescimento de micélio (2 DAI) e produção de conídios (3 ao 5 DAI), entretanto os volumes de água entre 120 ml (30%) e 180 ml (45%) manifestaram crescimentos superiores e que não diferiram entre si pelo teste aplicado a $P < 0.01$. A quantidade de 180 ml de água, que corresponde a 45% do volume de arroz, foi a que proporcionou a melhor homogeneidade de crescimento do fungo nas condições testadas, porém sem diferenças estatísticas em relação a 120, 140 e 160 ml, do início ao fim do experimento. De acordo com os resultados observados, o volume de 180 ml (45%) de água foi o selecionado para ser empregado no método M2 nos experimentos 2 e 3 (figura 3). Embora tenha sido adotada essa porcentagem de umidade no presente estudo, diferentes porcentagens são encontradas na literatura para multiplicação de fungo em arroz, com variação de 35 a 60% (ALVES & FARIA, 2010; SIMÕES, 2010; MARTINS, 2014). *Trichoderma* sp. apresenta baixo nível de tolerância osmótica, pois um excesso de umidade baixa a disponibilidade de oxigênio, limitando o desenvolvimento do fungo, e compacta o substrato, impedindo sua colonização total (PINEDA-INSUASTI *et al.*, 2017). Por outro lado, os mesmos autores comentam que uma baixa umidade inibe o desenvolvimento do fungo ao não permitir a mobilidade de nutrientes na solução, além de secar o micélio. O fungo pode crescer em uma gama de umidade do meio de 30 a 75%, ainda que Costa (2012) recomende uma umidade de 75% para a melhor produção do *Trichoderma* sp.

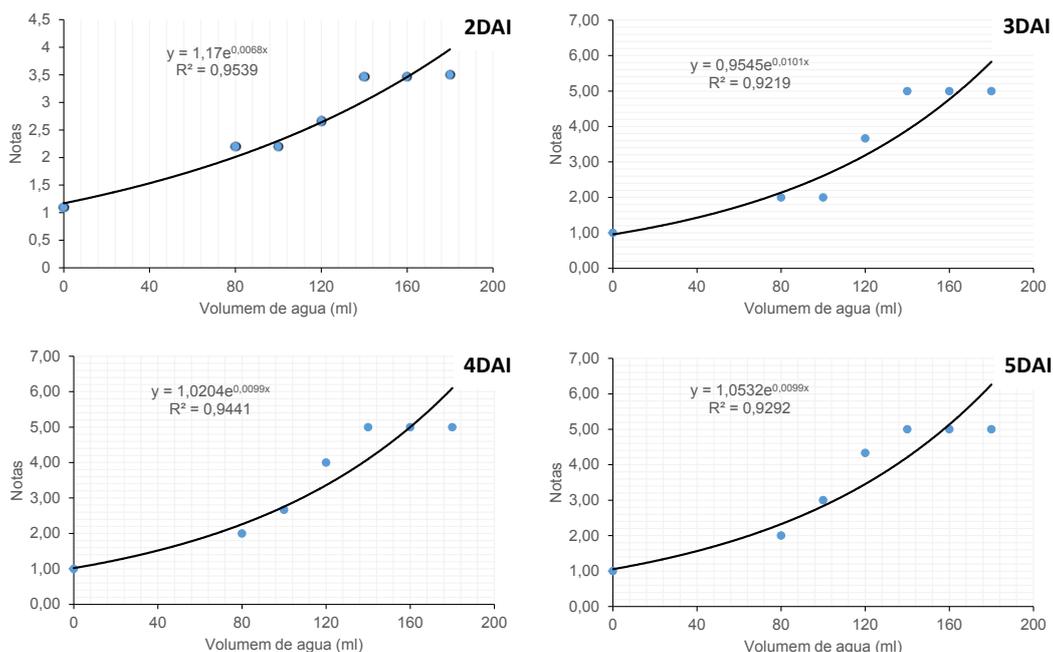


Figura 1 – Avaliações da variável nota ao considerar quatro “datas após a inoculação” (DAI) do arroz com *Trichoderma asperellum*, empregando sete quantidades diferentes de água (0, 80, 120, 140, 160 e 180 ml). No 2.º DAI avaliou-se o crescimento aparente do micélio; do 3.º ao 5.º DAI foi averiguada a produção aparente de conídios, Mineiros, Goiás, em 2018.

As análises de variância dos experimentos 2 e 3 constam da tabela 2, ficando evidenciado que existem diferenças significativas ($P < 0,05$) e altamente significativas ($P < 0,01$) entre os tratamentos testados para os dois experimentos, obtendo-se interações duplas e triplas, significativas para as variáveis testadas.

Tabela 2 – Resumo das análises de variância dos dois experimentos que testaram os dois métodos de processamento de arroz, duas posições e quatro diferentes áreas de fita microporosa em sacos contendo substrato de arroz parboilizado empregado na produção de *Trichoderma asperellum*, em Mineiros, GO, em 2018. Legenda: FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; PAC = peso do arroz colonizado; UFC = unidades formadoras de colônias; CV = coeficiente de variação.

FV	GL	Quadrados médios			
		Experimento 2		Experimento 3	
		PAC ¹ (g)	UFC ² (x10 ¹¹ ml ⁻¹)	PAC (g)	UFC (x10 ¹¹ ml ⁻¹)
Métodos (M)	1	2,37**	2,27**	9124,57**	0,049**
Posição (P)	1	0,0003 ^{ns}	3,61**	892,69**	0,023 ^{ns}
Fita (F)	3	0,0081*	0,81**	11341,28**	0,307**
M * P	1	0,015**	2,21**	518,77*	0,0408**
M * F	3	0,017**	0,59**	440,40**	0,0271**
P * F	3	0,00049 ^{ns}	0,27**	381,09*	0,0307**
M * P * F	3	0,00032 ^{ns}	0,41**	78,72 ^{ns}	0,0077 ^{ns}
Repetições	2	0,00032 ^{ns}	0,09 ^{ns}	14,85 ^{ns}	0,00083 ^{ns}
Erro	30	0,00024	0,04	97,73	0,0059
Total corrigido	47				
CV (%)		0,34	28,76	1,81	17,04
Média geral		450,29	2,24	546,52	0,081

*, ** e ^{ns} representam o nível de significância pelo teste F a 5%, 1% e não significativo, respectivamente.

No experimento 2, para a variável PAC, foi observada alta significância ($P < 0,01$) considerando as interações duplas M * P e M * F (M = método de processamento de arroz, P = duas posições, F = quatro dimensões de fita microporosa), sendo desdobradas e comparadas suas médias pelo teste t de Student (LSD – *least significant difference* / diferença mínima significante) na tabela 3. O resultado dessa variável foi o que motivou a realização do experimento 3. Durante a condução do experimento 2, notou-se que, após as 24 horas de esfriamento antecedendo a inoculação, os sacos apresentavam umidade inicial reduzida, a qual havia sido aferida em 400 g de arroz após a lavagem e umedecimento no método M1, apresentando divergência no peso final entre ambos os tratamentos, como constatado no teste estatístico (tabela 3). Um menor volume de arroz e a disposição do saco deitado já haviam sido observados em nosso laboratório como sendo a forma mais adequada para o desenvolvimento do fungo, para a obtenção de matrizes produzidas a partir do material comercial, sendo estas utilizadas como fonte de inóculo para obtenção de um novo lote de produto com qualidade similar ao inóculo proveniente da matriz.

Tabela 3 – Valores de médias do experimento 2 para a variável peso do arroz colonizado (PAC), nas interações que foram significativas ao avaliar dois métodos de processamento de arroz (M), duas posições (P) e quatro dimensões de fita microporosa (F), em sacos contendo arroz parboilizado (substrato), empregado na produção de *Trichoderma asperellum*, em Mineiros, GO, em 2018.

Variável	M	P		F (cm ²)			
		Horizontal	Vertical	0	10	20	30
PAC (g)	M1	362,08 a A	366,00 a B	356,80 a A	371,20 a C	365,78 a BC	362,37 a AB
	M2	538,23 b B	534,86 b A	576,83 b C	530,65 b B	520,32 b A	518,37 b A

Letra minúscula na coluna e maiúscula na linha representam diferenças estatísticas pelo teste t de Student (LSD) a $P < 0,05$.

Para a variável PAC, o M1 apresentou diferenças em relação ao M2 independentemente da posição (P) e do tamanho da fita (F), sendo os valores de M2 sempre superiores e estatisticamente distintos a $P < 0,05$. Esse viés inicial ao comparar volumes diferentes foi corrigido no experimento 3. Ainda para a variável PAC, os métodos foram influenciados pela posição dos sacos nas estantes, observando-se uma alteração do resultado de um método para outro, considerando que o M1 teve maior valor na posição vertical e o M2 na posição horizontal. Tal resultado vai em contradição com o que os autores de ambos os métodos recomendam.

O uso da fita microporosa é uma adaptação utilizada pela equipe do presente trabalho, com base nos resultados de outros produtores, entretanto não se trata de uma informação que tenha sido publicada. Inicialmente, o método M1 foi o modelo adotado para constituir a base do presente trabalho, porém, à medida que foram sendo conduzidas as atividades no laboratório, percebeu-se a necessidade da incorporação de outros detalhes que permitissem melhorar o processo de multiplicação do fungo e melhorar o trabalho operacional (figura 3B). Independentemente do método, para a variável PAC, o uso da fita microporosa exerceu forte influência caso se observem os distintos tamanhos, visto que a ausência da fita sempre promoveu valores menores (M1) ou maiores (M2), demonstrando a necessidade de aeração (oxigenação) para o fungo (MASCARIN & QUINTELA, 2013), resultado que será mais evidente quando analisada a variável UFC.

Ainda no experimento 2, a variável UFC mostrou diferenças altamente significativas na Anova ($P < 0,01$), com efeito para interação tripla (M * P * F) (tabela 2), sendo assim desdobrada a interação na tabela 4. Para a posição horizontal, o M2 e a F de 20 cm² promoveram as maiores quantidades de conídios, com 15×10^{11} ml⁻¹. Essa posição sempre produziu os maiores valores associados ao M2 em relação ao M1, exceto para os tratamentos com ausência de fita, quando se observou o contrário (figura 2A). Ainda em relação à posição horizontal, em M1 não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre as distintas áreas da fita, no entanto, para M2, independentemente do tamanho destas, foram encontradas variações, demonstrando que tal posição apresenta efeito sobre o crescimento do fungo. De modo geral, a posição vertical mostrou valores inferiores quando comparada com a horizontal, para todas as combinações, e sem diferenças estatísticas, demonstrando a efetividade da posição horizontal em relação à vertical para a variável UFC (tabela 4, figura 2A). A posição horizontal é a mais usada nos protocolos de produção de *Trichoderma* sp., todavia não existem, na literatura, trabalhos que relatem a sua efetividade em relação à posição vertical, fato que motivou a realização do presente estudo. A posição horizontal favorece a colonização do arroz pelo fungo, possivelmente pelo fato de este ser distribuído em uma fina camada (figura 2A), beneficiando uma melhor oxigenação e, por consequência, uma maior produção de conídios, embora relatos e evidências de produção de fungos em sacos na posição vertical sejam descritos. O M1 não foi influenciado pela posição dos sacos na sala de crescimento, contrapondo o observado em M2, que, sempre quando combinado com a posição horizontal, se mostrou superior na presença da fita microporosa. O experimento 3 teve o objetivo de reajustar a quantidade de arroz que estava sendo colocada em M1, para que fossem obtidos, na variável PAC, pesos inicialmente similares, fato que poderia influenciar a resposta da variável UFC e, estando essa situação contornada, seria possível avaliar o efeito do método para ambas as variáveis sem o viés do peso inicial (figura 2).

Após reajustada a quantidade de arroz nos sacos e a realização do experimento, foi efetuada a Anova, cujos resultados das variáveis PAC e UFC estão na tabela 2, obtendo-se interações significativas para todas as combinações duplas, com diferenças altamente significativas ($P < 0,01$) entre os tratamentos testados. O desdobramento dessas interações é demonstrado na figura 3, para a variável PAC (figuras 3A, B e E) e UFC (figuras 3C, D e F).

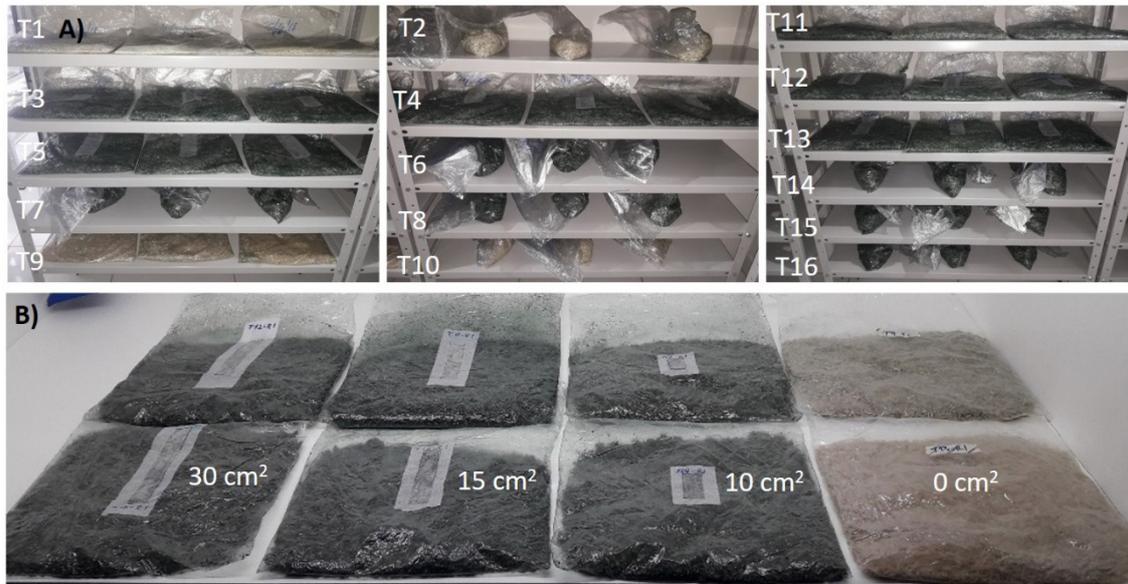


Figura 2 – Imagens ilustrando os tratamentos testados ao término do experimento 3 com seis dias de inoculação com *Trichoderma asperellum*. A) A disposição de todos os tratamentos que foram avaliados considerando os dois métodos: M1 (T1 a T8) e M2 (T9 a T16); duas posições, horizontal (T1, T3, T4, T5, T9, T11, T12 e T13) e em pé (T2, T6, T7, T8, T10, T14, T15 e T16) e comprimento da fita microporosa: 0 cm² (T1, T2, T9 e T10), 10 cm² (T3, T6, T11 e T14), 20 cm² (T4, T7, T12 e T15) e 30 cm² (T5, T8, T13 e T16). B) Detalhe do tamanho das fitas empregadas em Mineiros, Goiás, em 2018.

Diferentemente do obtido no experimento 2, na variável PAC, o M1 promoveu os maiores pesos independentemente do tamanho da fita microporosa (figura 3A) e da posição (figura 3B), em comparação com o M2. Ao avaliar os diferentes tamanhos da fita (figura 3E), a posição horizontal promoveu as maiores médias, com diferenças significativas para o tamanho de 10 e 30 cm² pelo teste t de Student (LSD) a $P < 0,05$. O método M1 apresentou maior teor de umidade no grão, fato que pode ser justificado pelas etapas de lavagens e pelo período de umedecimento do arroz antes da autoclavagem, favorecendo o peso final dos sacos. Notou-se que, à medida que o tamanho da fita aumentava, aliado às posições horizontais e verticais, os volumes tenderam a diminuir (figura 3A, 3B e 3E) e o peso foi reduzido independentemente do método empregado. Essa diminuição do peso está correlacionada com o aumento do crescimento do fungo e, considerando a variável UFC, ocorre o contrário, o método M2 promove as maiores taxas de esporulação com a presença da fita de 20 e 30 cm², com aproximadamente três vezes a quantidade do observado em M1, com diferenças altamente significativas (figura 3C). A posição horizontal também favorece o método M2 em relação ao M1, com médias bem superiores e significativas, no entanto M1 na posição vertical foi favorecido (figura 3D). A combinação da posição horizontal e os tamanhos da fita de 20 e 30 cm² promoveram as maiores médias, sendo a presença da fita imprescindível, levando em conta que, na sua ausência, o crescimento do fungo é quase nulo (figuras 3C e 3F), como verificado também no experimento 2.

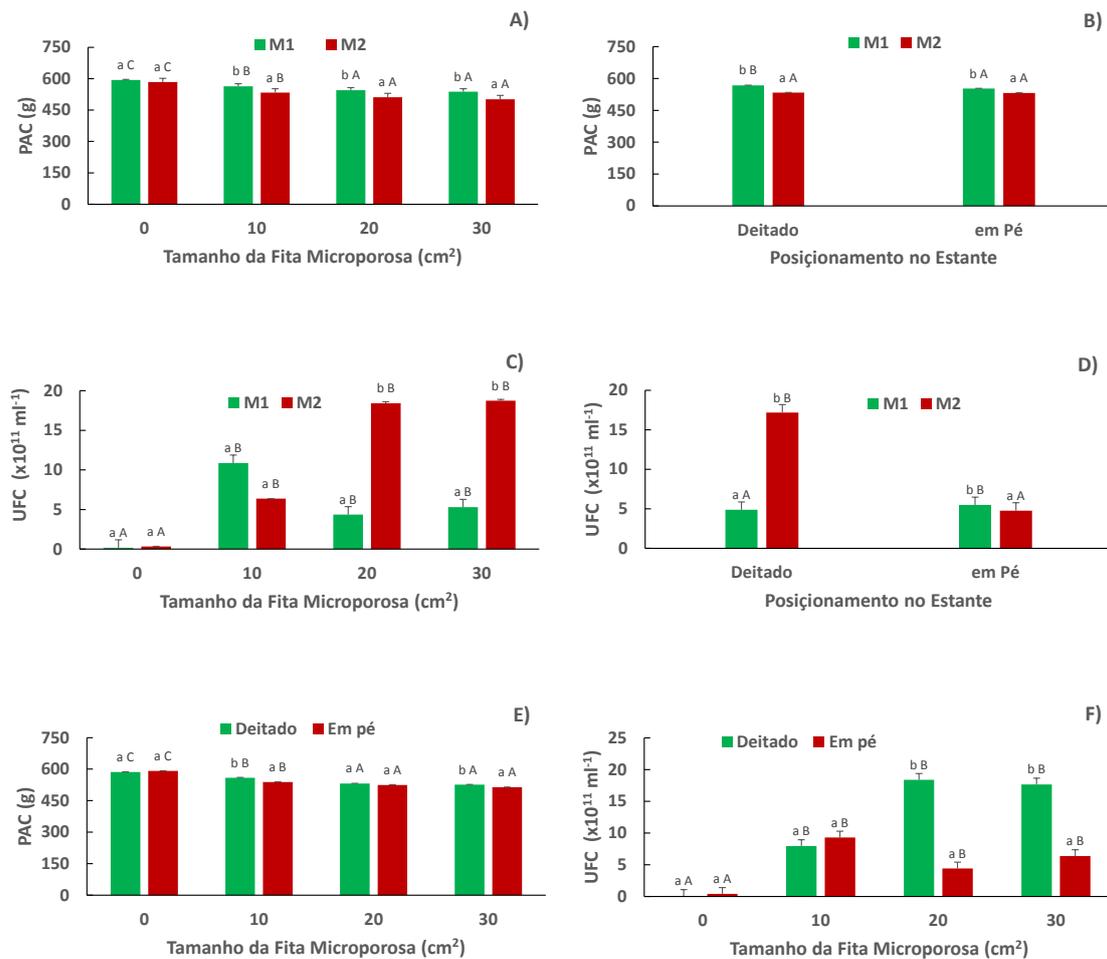


Figura 3 – Valores de médias do experimento 3 para as variáveis peso do arroz colonizado (PAC) e unidades formadoras de colônia (UFC) nas diferentes interações duplas significativas, ao avaliar dois métodos de processamento de arroz (M), duas posições (P) e quatro dimensões de fita microporosa (F) em sacos contendo substrato de arroz parboilizado empregado na produção de *Trichoderma asperellum*. Letras minúsculas e maiúsculas representam as comparações do fator interno e a do eixo x, respectivamente pelo teste t de Student (LSD) ao $P < 0.05$, em Mineiros, Goiás, em 2018.

Diversos estudos relatam amplas variações em relação à produção de esporos de *Trichoderma* spp. em substratos distintos. Hanada & Costa (2018), ao avaliar a produção em *T. martiale* utilizando arroz como substrato de crescimento, suplementado com diferentes nutrientes, constataram variação de 1,53 a 10,17 $\times 10^7$ conídios por grama de arroz. Simões (2010), comparando diferentes isolados de *Trichoderma*, também usando arroz como substrato, verificaram produção de esporos variando de 0,13 $\times 10^8$ a 35,23 $\times 10^8$.gds⁻¹. Segundo Rini & Sulochana (2007), diferentes substratos podem ser adotados para a multiplicação de *Trichoderma* spp., tais como sorgo, arroz, esterco de gado e outros, sendo observadas diferentes concentrações na produção de conídios (10,3 a 156,3 $\times 10^8$ UFC g⁻¹). Os resultados citados, comparados com os obtidos no presente estudo, mostram que o fungo *T. asperellum* multiplicado em arroz apresentou uma ótima produção.

A otimização do processo de produção constitui uma tarefa nada fácil, pois nem sempre as condições ideais são mantidas ou alcançadas, necessitando que o processo esteja sob constante ajuste. A identificação dos gargalos de todo o processo é o que levará ao sucesso da produção, ao reconhecer e solucionar os problemas na mesma velocidade com que estes aparecem. Sendo assim, no processo de produção do presente trabalho, identificaram-se atividades e métodos que

necessitavam ser ajustados para que a produção avançasse e garantisse uma crescente demanda de produto.

Inicialmente, o contato com outras equipes de trabalho foi o maior incentivo de mudança no processo de produção, partindo da qualidade inicial obtida, até o momento da introdução das mudanças que determinaram a qualidade da produção. O método inicialmente empregado (M1) era laborioso e foi o primeiro gargalo a ser superado e, com as simples mudanças descritas no M2, conseguiu-se dar um salto na redução do tempo de trabalho e até na qualidade, considerando que o M2 promoveu os maiores valores de UFC, fato confirmado nos experimentos 2 (tabela 4) e 3 (figura 3D).

O posicionamento dos sacos nas estantes da sala de crescimento era outro gargalo, pois havia uma maior demanda por espaço para aumentar a produção. A posição horizontal é mais comumente utilizada, como relatado no método M1, em que a produção de fungos, especificamente *Metarhizium*, apresenta ótimos resultados com o emprego desse método, o que motivou o presente trabalho a testar o contraste das duas posições. Para a produção de *T. asperellum*, a posição horizontal foi a que demonstrou os melhores resultados, independentemente do método empregado e do tamanho da fita microporosa testada, o que obriga a aumentar a área disponibilizada para o crescimento, visando solucionar o gargalo referente a espaço. A inclusão do uso da fita microporosa ocorreu por meio da troca de informações com outro grupo de pesquisa que ainda não havia testado a variação quanto ao tamanho da fita, mas já a vinha utilizando e obtendo ótimos resultados, motivando a equipe do presente trabalho a usar e a testar o tamanho ideal, cuja finalidade principal era a redução do custo com tal acessório, já que uma grande quantidade de fita seria empregada no processo para atender ao volume necessário de arroz colonizado. A presença da fita é fator determinante na quantidade de conídios, aferida pela variável UFC; na sua ausência, o fungo tem baixa taxa de crescimento e produção, independentemente do método (figura 3C) e da posição do saco (Fira 3F) na sala de crescimento (figura 2). O tamanho de 20 cm² foi o que apresentou o melhor desempenho considerando a variável UFC, fato que pode ser observado nos dois experimentos testados (tabela 4 e figura 3).

Com os resultados obtidos no presente estudo, afirma-se que o método M2 (400 g de arroz com 180 ml de água), aliado à posição horizontal e ao tamanho de 20 cm² de fita, promove o maior desenvolvimento do fungo *T. asperellum*. A produção “on farm” para a espécie é possível de ser realizada nas condições do Brasil, mantendo um padrão de qualidade e controle de produção, sendo necessários ajustes no processo produtivo e uso de mão de obra qualificada para a função.

REFERÊNCIAS

- Al-Hazmi, A. S. & Tariqjaveed, M. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viridae* against *Meloidogyne javanica* on tomato. Saudi Journal of Biological Sciences. 2016; 23: 288-292.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>
- Alves, R. T. & Faria, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2010. 50 p.
- Barbosa, T. S., Andrade, D. J., Polanczyk, R. A. & Duarte, R. T. Susceptibility of *Tetranychus ogmophallos* (Acari: Tetranychidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Florida Entomologist. 2018; 101(2): 249-253.
doi: <http://dx.doi.org/10.1653/024.101.0215>
- Bernardo, J. T., Aguilera, J. G., da Silva, R. B., Vian, R., Niella, G. R., Ulhoa, C. J. & Medeiros, I. R. E. Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. Revista Eletrônica Científica da UERGS. 2019; 5(3): 263-270.
doi: <https://doi.org/10.21674/2448-0479.53.263-270>
- Bettiol, W. & Morandi, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2009. 341p.

- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W. & Samuels, G. J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. IMA Fungus. 2015; 6(2): 263-295.
doi: <http://dx.doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02>
- Carvalho, D. D. C., Geraldine, A. M., Lobo Junior, M. & Mello, S. C. M. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2015; 50(12): 1220-1224.
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015001200012>
- Carvalho Filho, M. R., Martins, I., Peixoto, G. H. S. & Mello, S. C. M. Biological control of leaf spot and growth promotion of *Eucalyptus* plants by *Trichoderma* spp. Journal Agricultural Science. 2018; 10(9): 459-467.
doi: <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v10n9p459>
- Costa, J. L. Seleção de fungos endofíticos produtores de ácido indol acético (AIA) para formulação de inoculantes [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2012.
- Dabire, T. G., Bonzi, S., Somda, I. & Legrève, A. Evaluation of the potential of *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter and biocontrol agent against *Fusarium* damping-off in onion in burkina faso. Asian Journal of Plant Pathology. 2016; 10(4): 49-60.
doi: <http://dx.doi.org/10.3923/ajppaj.2016.49.60>
- Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. IV Curso Teórico e Prático: avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*. Brasília; 2012, 46 p. [Acesso em: 28 jul. 2018]. Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/trichoderma/Apostila_Trichoderma_2012.pdf.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Itália; 2016. [Acesso em: 15 ago. 2018]. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/901168/>.
- Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia. 2011; 35: 1039-1042.
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Garcia, J. F., Macedo, L. P. M. & Botelho, S. M. As cigarrinhas da cana-de-açúcar. In: Boletim Técnico Biocontrol 1: controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho; 2006. p. 29-33.
- Groth, M., Filho, R., Soares, V. & Bernardi, D. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* isolates on *Nezara viridula* and *Dichelops melacanthus* in wheat crop. Arquivos do Instituto Biológico. 2017; 84: 1-8.
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000032016>
- Guimarães, G. R., Ferreira, D. S., Galvão, C. S., Mello, S. C. M. & Carvalho, D. D. C. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*. Pesquisa Agropecuária. 2016; 21(1): 7-11.
doi: <http://dx.doi.org/10.12661/pap.2016.002>
- Hanada, R. E. & Costa, I. B. Efeito da inoculação fúngica de *Trichoderma martiale* como agente biocontrole contra podridão parda do cacauero. In: Souza, L. A. G. de, Silva Filho, D. F., Benavente, C. A. T., Noda, H. Ciência e tecnologia aplicada aos agroecossistemas da Amazônia Central. Manaus: Inpa; 2018. p. 133-142.
- Jindapunnapat, K., Chinnasri, B. & Kwankuae, S. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne enterolobii*) in guava by the fungus *Trichoderma harzianum*. Journal of Development Sustainable Agriculture. 2013; 8: 110-118.
doi: <https://doi.org/10.11178/jdsa.8.110>
- Lorencetti, G., Potrich, M., Mazaro, S., Lozano, E., Barbosa, L., Menezes, M. & Gonçalves, T. Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Isaria* sp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). Ciência Florestal. 2018; 28(1): 403-411.
doi: <https://doi.org/10.5902/1980509831612>
- Martins, C. C. Seleção e caracterização de isolados do fungo *Beauveria bassiana* visando o controle do ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) (Acari: Tarsonemidae) [Dissertação de Mestrado]. Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2014.

- Mascarin, G. M. & Quintela, E. D. Técnica de produção de fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; 2013. 18 p.
- Mesquita, D. C. M., Ferreira, F. A., Martins, I., Mello, S. C. M. & Carvalho, D. D. C. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* do feijão comum. Agropecuária Científica no Semiárido. 2017; 13(1): 1-4.
doi: <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v13i1.710>
- Milan, M. D., Barroso, F. M., Mello, S. C. M., Araújo, M. S. & Carvalho, D. D. C. Regimes de luz na produção de conídios de *Trichoderma harzianum* para controle do mofo branco em feijoeiro. Pesquisa Agropecuária. Tropical, 2015; 45(4): 434-439.
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v45i37755>
- Neves, P. M. J. O., Santoro, P. H. & Silva, R. Z. da. Utilização de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill no manejo integrado da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). In: Vezon, M., De Paula JR., J. T. & Pallini, A. (eds.). Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: Epamig; 2006. p. 137-158.
- Pineda-Insuasti, J. A., Benavides-Sotelo, E. N., Duarte-Trujillo, A. S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S. & Álvarez-Ramos, S. E. Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. Revista ICIDCA. 2017; 51(1): 47-52.
- Rini, C. R. & Sulochana, K. K. Substrate evaluation for multiplication of *Trichoderma* spp. Journal of Tropical Agriculture. 2007; 45: 58-60.
- Roese, A. D., Vidal, G. S., Zielinski, E. C. & Mio, L. L. M. Native *Trichoderma* grown on oat grains controls damping-off and enhances height in soybean. Pesquisa Agropecuária Tropical. 2017; 47(1): 102-109.
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632016v47i42966>
- Sahebani, N. & Hadavi, N. Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology & Biochemistry. 2008; 40(8): 2016-2020.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011>
- Santos, F. J., Ferreira, J. M. S., Ribeiro, V. J. O., Oliveira, A. C. L. & Azevedo, A. G. C. Protocolo de produção massal de fungos entomopatogênicos: *Hirsutella thompsonii* (Fischer). Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros; 2009. 24 p.
- Simões, M. L. G. Controle biológico de *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa do cacauero, por diferentes espécies e linhagens de *Trichoderma* spp [Tese de Doutorado]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2010.