

Estado da publicação: O preprint não foi publicado em outro meio.

# O pH da suspensão influencia na germinação de conídios de *Trichoderma harzianum*?

Iohana Barreto Amaral, Neder Henrique Martinez Blanco, Felipe André Sganzerla Graichen

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.14375>

Submetido em: 2025-12-01

Postado em: 2025-12-04 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

## **O pH da suspensão influencia na germinação de conídios de *Trichoderma harzianum*?**

Amaral, Iohana Barreto

[iohanahsamaral@gmail.com](mailto:iohanahsamaral@gmail.com) - <https://orcid.org/0009-0005-6426-8254>

Blanco, Neder Henrique Martinez

[nederblanco@hotmail.com](mailto:nederblanco@hotmail.com) - <https://orcid.org/0000-0002-6786-5493>

Graichen, Felipe André Sganzerla

[felipeandre@uems.br](mailto:felipeandre@uems.br), [f\\_graichen@yahoo.com.br](mailto:f_graichen@yahoo.com.br) - <https://orcid.org/0000-0003-0516-5042>

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - Campus de Aquidauana - Aquidauana, Mato Grosso do Sul – Brasil

**RESUMO:** Os fungos do gênero *Trichoderma* são importantes no manejo fitossanitário, apresentando mecanismos que podem ser utilizados para o biocontrole de doenças em plantas. Para assegurar a eficiência do biocontrole, é importante que as condições de aplicação garantam o desenvolvimento e competição do antagonista. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH sobre a germinação dos conídios de *Trichoderma harzianum*. Foram realizados ensaios para avaliar a germinação dos conídios do fungo sob diferentes condições de pH. Para isso, foram preparadas soluções tampão ácido cítrico-fosfato de sódio com pH entre 2,6 e 8,6, realizou-se a diluição seriada do produto comercial até a concentração de  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, preparou-se suspensão de conídios em meio tamponado (Suspensão tampão + Tween 0,01%) com pH desejado, sendo mantido na suspensão durante 4 horas. Realizou-se também um segundo ensaio para avaliar o efeito de germinação dos conídios sobre o pH de meio não tamponado. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e teste Tukey a 5%. Os dados de alteração de pH ao longo do tempo foram submetidos à análise de regressão linear. Após as análises, observou-se que o pH 4,6 foi aquele que proporcionou maior germinação do fungo, enquanto em pH alcalino o fungo apresenta

baixa germinação. Houve acidificação do meio em decorrência da presença dos conídios. Os dados indicam que o pH é um fator determinante na manutenção da atividade biológica do antagonista, sobretudo o pH da calda de aplicação.

**PALAVRAS-CHAVE:** antibiose; biocontrole; tecnologia de aplicação.

### **Does the pH of the suspension influence the germination of *Trichoderma harzianum* conidia?**

**Abstract:** Fungi of the genus *Trichoderma* are important in phytosanitary management, presenting mechanisms that can be used for the biocontrol of plant diseases. To ensure the efficiency of biocontrol, it is important that the application conditions guarantee the development and competition of the antagonist. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of pH on the germination of *Trichoderma harzianum* conidia. Tests were carried out to evaluate the germination of the fungus's conidia under different pH conditions. For this, citric acid-sodium phosphate buffer solutions with pH between 2.6 and 8.6 were prepared, and serial dilutions of the commercial product were performed until a concentration of  $10^5$  conidia.mL<sup>-1</sup> was reached. Then, a conidial suspension was prepared in buffered medium (Buffer suspension + Tween 0.01%) with the desired pH, and maintained in suspension for 4 hours. A second test was also carried out to evaluate the effect of conidial germination on the pH of unbuffered medium. The data were subjected to Shapiro-Wilk normality tests and Tukey's test at 5%. Data on pH change over time were subjected to linear regression analysis. After analysis, it was observed that pH 4.6 provided the highest fungal germination, while at alkaline pH the fungus showed low germination. Acidification of the medium occurred due to the presence of conidia. The data indicate that pH is a determining factor in maintaining the biological activity of the antagonist, especially the pH of the

application solution.

Keywords: antibiosis; biocontrol; application technology

O gênero *Trichoderma* compreende fungos filamentosos habitantes do solo, que possuem uma ampla diversidade de mecanismos de biocontrole, sendo importantes no controle biológico (COLLINGE et al., 2022). No entanto, ainda que os fungos do gênero *Trichoderma* possuam mecanismos para competir ou reduzir o crescimento de patógenos, sua eficácia pode ser limitada pelas condições de incubação, armazenamento e aplicação (BLANCO; MENDONÇA; GRAICHEN, 2022; FERREIRA; MUSUMECI, 2021).

É importante ressaltar que os fungos utilizados no biocontrole são organismos vivos e, portanto, sensíveis às condições ambientais às quais são submetidos (BLANCO; MENDONÇA; GRAICHEN, 2022). Os produtos formulados comerciais brasileiros à base de *Trichoderma* utilizam conídios ativos, que necessitam de condições específicas para germinar. Nesse sentido, é importante que as condições de incubação, aplicação e de campo assegurem a manutenção de suas atividades biológicas para expressão de seus mecanismos de controle (CORTÉS-ROJAS et al., 2021). Entre os fatores que são mais importantes para garantir a viabilidade e a germinação dos conídios estão a temperatura, a radiação e o pH (MARTINEZ et al., 2023). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do pH da suspensão sobre a germinação dos conídios de *Trichoderma harzianum*.

Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar a germinação dos conídios de *Trichoderma harzianum* (Trichodermil<sup>®</sup>, CEPA ESALQ 1306 - Registro no MAPA 2007) sob diferentes condições de pH. Para isso, foram preparadas uma série de soluções tampão, misturando-se proporções apropriadas de ácido cítrico 0,1 M (Dinâmica, anidro, 99,5%) e fosfato de sódio monobásico 0,2 M (Dinâmica, 99%), obtendo-se os pHs 2,6; 3,6; 4,6; 5,6; 6,6;

e 7,6, para obtenção do pH 8,6 foi realizada a mistura de proporções de ácido cítrico 0,15 M (Dinâmica, anidro, 99,5%) e fosfato de sódio monobásico 0,15 M (Dinâmica, 99%). As proporções utilizadas para obtenção do pH 8,6 foram calculadas em separado, pois não eram contempladas pelo modelo original. Para realização dos experimentos, o produto comercial a base de *Trichoderma harzianum* foi diluído à concentração de  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

Em seguida, preparou-se suspensão de conídios em meio tamponado (Suspensão tampão + Tween 0,01%) com pH desejado, sendo mantidos na suspensão durante 4 horas, com agitação da suspensão a cada uma hora, para evitar sedimentação de conídios. Após o período, depositou-se 25 µL dessa suspensão diluída em quatro pontos diferentes nas placas de Petri contendo meio de cultura Ágar-Água e incubados durante 20 horas a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Após a incubação, a porcentagem de germinação foi quantificada pela contagem de 100 conídios por pontos na placa para cada pH testado nas três placas, sendo cada uma das placas uma repetição. O conídio foi considerado germinado quando o comprimento do tubo germinativo excedeu a metade do comprimento do conídio, como considerado para outros (BOERSMA et al., 2020; GORTIKOV et al., 2022). O experimento foi repetido três vezes para confirmação dos dados. Realizou-se também um ensaio para avaliar a variação do pH em função do tempo com e sem presença de conídios de *T. harzianum*. Assim, foram preparadas suspensões de conídios não tamponadas, adicionando-se o formulado comercial do fungo ( $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>), que foram avaliadas durante 4 horas, medindo-se o pH da suspensão em intervalos de 30 minutos.

O efeito do pH na redução da germinação dos conídios foi calculado com base na proporção de conídios germinados e não germinados. Todos os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado onde cada repetição continha 400 conídios por placa. Os dados de germinação dos conídios foram coletados e submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e análise de variâncias seguida de teste de Tukey a 5%. Os dados de alteração de

pH ao longo do tempo foram submetidos à análise de regressão linear. Os testes estatísticos foram executados com auxílio do suplemento Análise de Dados do Microsoft Office Excel e da plataforma RunData (ROSA; SILVA, 2020).

Após as análises, foi possível observar efeito significativo do pH sobre a germinação do fungo (Figura 1). A germinação de conídios foi maior em pH 4,6 do que nas outras faixas, sendo consideravelmente menor em pH próximos da neutralidade a alcalino. Em pH 3,6 os conídios apresentaram menor germinação do que nos pH 2,6 e 4,6, não sendo possível afirmar que há maior germinação em pH ácido do que nos alcalinos. Outros trabalhos relatam redução de crescimento micelial em meios com pH 3,0, no entanto em pHs alcalinos as taxas de crescimento são variáveis em função da espécie ou do isolado de *Trichoderma* spp. (CABRAL-MIRAMONTES et al., 2022; ZEHRA et al., 2017). Em *Trichoderma atroviride* também se observa a impossibilidade de indicação de faixas ideais, havendo comportamentos específicos para cada pH (DARYAEI et al., 2016).

Além de fatores genéticos existem fatores ambientais que atuam no processo de germinação; em fungos filamentosos, a temperatura, potencial hídrico e a concentração de carboidratos têm sido reportadas como agentes limitantes para a germinação (HALLSWORTH; MAGAN, 1996; POLOZSÁNYI et al., 2021). Todavia, ainda há pouca informação sobre o efeito do pH sobre a germinação. Em *Rhizophus delemar*, a germinação dos esporos é reduzida em pHs ácidos ou alcalinos, sendo maior próximo à neutralidade (TURGEMAN et al., 2016). Os autores associam a redução da germinação com a redução da atividade de aquaporinas mediada pelo pH do meio, mas este processo ainda necessita ser elucidado para os fungos do gênero *Trichoderma*.

Na avaliação dos efeitos de *Trichoderma harzianum* sobre o pH da suspensão, foi possível observar diferenças entre o pH inicial e aquele observado ao fim do experimento (Figura 2). Houve redução do pH inicial nas duas soluções, indo de pH 7 para 6 após 60 minutos

na ausência de conídios de *T. harzianum*, mantendo-se estável após esse período. Por outro lado, o pH da suspensão de conídios foi acidificado de 7 a 4,5. Observou-se que, após 180 minutos, o pH da suspensão já estava próximo aquele em que se observou maior germinação no primeiro experimento. Estudos realizados com *Trichoderma atroviride* indicam que a produção e a germinação de conídios dependem da faixa de pH e da capacidade do fungo em modificar o pH do meio (DARYAEI et al., 2016).

É importante ressaltar que o efeito do biocontrole depende das condições ambientais, sobretudo em *Trichoderma* (DARYAEI et al., 2016). Nesse contexto, considerando que a aplicação de agentes de biocontrole frequentemente é realizada em caldas e com mistura em tanque de produtos, a adequação do pH pode ser crítico para a viabilidade dos conídios de *Trichoderma* podendo reduzir o efeito do controle biológico. Mais estudos são necessários para determinar isolados ou espécies mais tolerantes às condições de aplicações ou a adequação de novas formas de aplicação dos agentes de controle biológico.

#### **AUTHORSHIP CONTRIBUTION (CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA)**

Amaral, Iohana Barreto

Formal analysis (Equal); Investigation (Lead); Resources (Supporting); Validation (Equal);  
Writing - original draft (Lead); Writing - review & editing (Equal)

Blanco, Neder Henrique Martinez

Conceptualization (Equal); Data curation (Lead); Formal analysis (Equal); Investigation (Equal); Methodology (Equal); Project administration (Equal); Resources (Lead); Supervision (Lead); Validation (Equal); Visualization (Equal); Writing - original draft (Equal); Writing - review & editing (Equal)

Graichen, Felipe André Sganzerla

Conceptualization (Equal); Data curation (Equal); Funding acquisition (Lead); Methodology

(Equal); Project administration (Equal); Validation (Equal); Writing - review & editing (Equal)

**AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL (declaração de disponibilidade de dados de pesquisa)**

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**FUNDING**

Not applicable.

**CONFLICTS OF INTEREST**

All authors declare that they have no conflict of interest.

**ETHICAL APPROVAL**

Not applicable.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BLANCO, N. H. M.; MENDONÇA, C. G.; GRAICHEN, F. A. S. Efficiency and delivery methods of *Trichoderma harzianum* on biological control against southern blight in sweet pepper. *Brazilian Journal of Agricultural Sciences*, Recife - PE, v. 17, n. 2, p. 1–7, 2022.

Disponível em: <https://doi.org/10.5039/agraria.v17i2a1884>

BOERSMA, S. J.; DEPUYDT, D. J.; VYN, R. J.; GILLARD, C. L. Fungicide efficacy for control of anthracnose of dry bean in Ontario. *Crop Protection*, Guildford, Eng, v. 127, p. 104979, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104979>

CABRAL-MIRAMONTES, J. P.; OLMEDO-MONFIL, V.; LARA-BANDA, M.; ZÚÑIGA-

ROMO, E. R.; ARÉCHIGA-CARVAJAL, E. T. Promotion of plant growth in arid zones by selected *Trichoderma* spp. strains with adaptation plasticity to alkaline pH. *Biology*, v. 11, n. 8, p. 1206, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology11081206>

COLLINGE, D. B.; JENSEN, D. F.; RABIEY, M.; SARROCCO, S.; SHAW, M. W.; SHAW, R. H. Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? *Plant Pathology*, Oxford - OX, v. 71, n. 5, p. 1024–1047, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ppa.13555>

CORTÉS-ROJAS, D.; BELTRÁN-ACOSTA, C.; ZAPATA-NARVAEZ, Y.; CHAPARRO, M.; GÓMEZ, M.; CRUZ-BARRERA, M. Seed coating as a delivery system for the endophyte *Trichoderma koningiopsis* Th003 in rice (*Oryza sativa*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 105, n. 5, p. 1889–1904, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11146-9>

DARYAEI, A.; JONES, E. E.; GLARE, T. R.; FALLOON, R. E. pH and water activity in culture media affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, United States, v. 92, n. 1, p.24-30. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.001>

FERREIRA, F. V.; MUSUMECI, M. A. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford - OX, v. 37, n. 5, p. 90, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03058-7>

GORTIKOV, M.; YAKUBOVICH, E.; WANG, Z.; LÓPEZ-GIRÁLDEZ, F.; TU, Y.; TOWNSEND, J. P.; YARDEN, O. Differential expression of cell wall remodelling genes is part of the dynamic phase-specific transcriptional program of conidial germination of *Trichoderma asperelloides*. *Journal of Fungi*, Basel, v. 8, n. 8, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof8080854>

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Culture age, temperature, and pH. affect the polyol and

trehalose contents of fungal propagules. *Applied and environmental microbiology*, Washington, v. 62, n. 7, p. 2435–2442, 1996. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/aem>

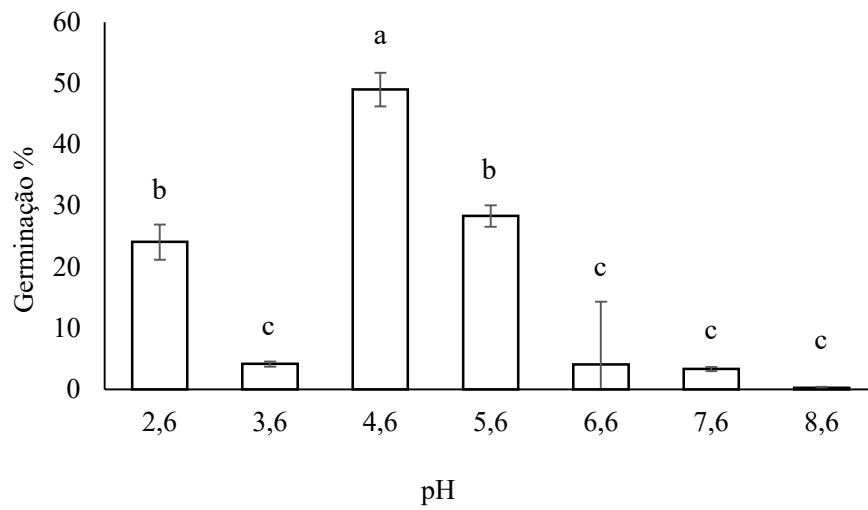
MARTINEZ, Y.; RIBERA, J.; SCHWARZE, F. W. M. R.; DE FRANCE, K. Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 107, n. 18, p. 5595–5612, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12687-x>

POLOZSÁNYI, Z.; KALIŇÁK, M.; BABJAK, M.; ŠIMKOVIČ, M.; VAREČKA, L. How to enter the state of dormancy? A suggestion by *Trichoderma atroviride* conidia. *Fungal Biology*, Amsterdam, v. 125, n. 11, p. 934–949, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.07.001>

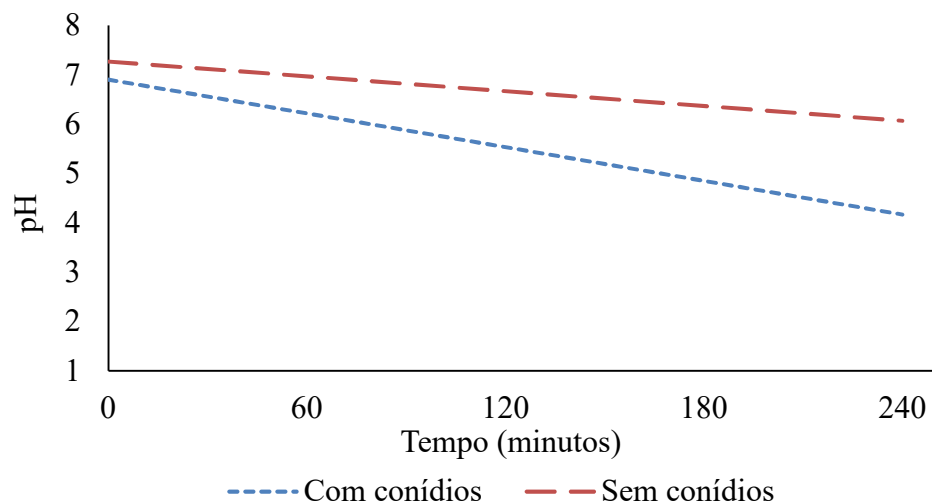
ROSA, A. G.; SILVA, M. L. da. RunData: an easy and intuitive online tool for statistical analyses. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Londrina - PR, v. 20, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1984-70332020v20n3s36>

TURGEMAN, T.; SHATIL-COHEN, A.; MOSHELION, M.; TEPER-BAMNOLKER, P.; SKORY, C. D.; LICHTER, A.; ESHEL, D. The role of aquaporins in pH-dependent germination of *Rhizopus delemar* spores. *PLoS ONE*, San Francisco - CA, v. 11, n. 3, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150543>

ZEHRA, A.; DUBEY, M. K.; MEENA, M.; UHPHADYAY, R. S. Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species. *Journal of Environmental Biology*, Lucknow, v. 38, n. 2, p. 197–203, 2017.



**Figura 1.** Germinação de conídios de *Trichoderma harzianum* comercial em função dos diferentes pH no qual foram incubados. Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). A barra de erros representa o erro padrão. Cv: 11%.



**Figura 2.** Alteração do pH da suspensão não tamponada ao longo do tempo, com ( $R^2_{aj}=0,93$ ) e sem ( $R^2_{aj}=0,67$ ) adição de conídios *Trichoderma harzianum*.

## Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.