

# Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja

## Biocontrol of *Fusarium* spp. with *Trichoderma* spp. and growth promotion in soybean seedlings

Paola M. Milanesi<sup>1</sup>, Elena Blume<sup>1</sup>, Zaida Inês Antonioli<sup>2</sup>, Marlove Fátima B. Muniz<sup>1</sup>, Ricardo Feliciano dos Santos<sup>1</sup>, Geísa Finger<sup>1</sup> e Miria Rosa Durigon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais (CCR), Departamento de Defesa Fitossanitária, 97105-900, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. E-mails: paola.milanesi@gmail.com, author for correspondence; elenablu@gmail.com; marlovemuniz@yahoo.com.br; ricardoijui@hotmail.com; ge\_finger@yahoo.com.br; midurigon@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia do Solo e do Ambiente, UFSM, CCR, Departamento de Solos, 97105-900, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: zantonioli@gmail.com.

Recebido/Received: 2012.12.13  
Aceitação/Accepted: 2013.06.03

### RESUMO

A patogenicidade e o biocontrole de *Fusarium oxysporum* (F1s, F3s e F4s) e *F. proliferatum* (F2s) por *Trichoderma koningiopsis* (T1s e T3s), *T. tomentosum* (T2s e T4s) e *T. asperellum* (T5s) foi avaliada. Testes *in vitro*, confrontação direta, e *in vivo*, por inoculação de substrato com *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp., isolados e combinados, foram conduzidos em condições controladas. A habilidade de *Fusarium* spp. causarem *damping off* em plântulas de soja, cv. 'FT-Estrela', foi avaliada *in vivo* em tratamentos que receberam apenas inóculo de *Fusarium* spp. isolados de *Trichoderma* spp. promoveram o crescimento de raiz e incrementaram o peso fresco e seco de plântulas de soja. Os isolados de *Fusarium* spp. F1s e F4s foram os mais agressivos, com 100 e 75% de *damping off*, respectivamente. Algumas combinações com *Trichoderma* spp. potencializaram a patogenicidade de F1s e F3s, com 100 e 75% de *damping off*, respectivamente. Os isolados de *Trichoderma* spp. podem controlar *Fusarium* spp. avaliados neste estudo.

**Palavras-chave:** *Glycine max* L. [Merrill], micoparasitismo, antibiose, *damping off*

### ABSTRACT

Pathogenicity and biocontrol of *Fusarium oxysporum* (F1s, F3s and F4s) and *F. proliferatum* (F2s) by *Trichoderma koningiopsis* (T1s and T3s), *T. tomentosum* (T2s and T4s) and *T. asperellum* (T5s) was evaluated. *In vitro* tests, direct confrontation, and *in vivo*, substrate inoculation with *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp., isolated or combined, were conducted under controlled conditions. The ability of *Fusarium* spp. cause *damping off* in seedlings of soybean cv. 'FT-Estrela', was evaluated *in vivo* in treatments that received only inoculum of *Fusarium* spp. *Trichoderma* spp. isolates promoted root growth and increased the fresh and dry weight of soybean seedlings. *Fusarium* spp. isolates F1s and F4s were the most aggressive, with 100 and 75% of *damping off*, respectively. Some combinations with *Trichoderma* spp. potentiated the pathogenicity of F1s and F3s, with 100 and 75% of *damping off*, respectively. The *Trichoderma* spp. can control *Fusarium* spp. evaluated in this study.

**Keywords:** *Glycine max* L. [Merrill], mycoparasitism, antibiosis, *damping off*

### Introdução

*Fusarium* é um dos mais abundantes gêneros de fungos de solo, englobando espécies de importância ambiental, agrícola e, até mesmo, relacionadas a doenças em humanos e animais (Wakelin *et al.*, 2008). Podem ser patogênicos a uma grande variedade de plantas, muitas delas de interesse econômico, provocando doenças como murcha vascular, *damping*

*off* e podridões de raiz e colo (Agrios, 2005; Wakelin *et al.*, 2008). Esses fatores combinados com a densidade populacional podem estar relacionados ao clima, ao tipo de vegetação, à microbiota, aos nutrientes e ao tipo de solo (Saremi *et al.*, 1999). Algumas interações entre patógenos e raízes de plantas ocorrem conforme a resposta dos micro-organismos a condições de aeração e penetração, além de estresse causado pela umidade do solo. Esses

fatores podem proporcionar maior severidade da doença, tais como observado na podridão de raízes do feijoeiro, causada por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burkh.) W.C. Snyder & H.N. Hansen 1941, em condições de atmosfera com deficiência de O<sub>2</sub> e com abundância de N<sub>2</sub> (Allmaras *et al.*, 1988). Adicionalmente, sintomas típicos de Podridão Vermelha da Raiz (PVR) em soja, provocada por *Fusarium solani* Species Complex (Aoki *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2005; Scandiani *et al.*, 2010), foram mais evidentes em parcelas conduzidas sob irrigação e com compactação do solo (Neto *et al.*, 2006).

A complexidade do sistema solo e a variabilidade genética existente no gênero *Fusarium*, tornam as doenças causadas por esses fungos de difícil controle. Dessa forma, recomenda-se a combinação de várias medidas que, conjuntamente, podem fornecer resultados positivos. Entre essas, pode-se citar o controle biológico, que preconiza o uso de micro-organismos antagonistas capazes de interferir na sobrevivência ou nas atividades determinantes da doença provocadas pelo fitopatógeno (Bettiol e Ghini, 1995). A seleção de um bom agente de controle biológico deve levar em consideração as interações entre o antagonista e o patógeno, além das condições ambientais que podem influenciar essas interações (Palazzini *et al.*, 2007).

O gênero fúngico *Trichoderma* inclui espécies antagonistas a vários fitopatógenos, sendo que os principais mecanismos empregados por esses fungos são o micoparasitismo e a antibiose (Woo *et al.*, 2005; Hermosa *et al.*, 2012), contudo ainda faltam informações de sua utilização no controle de *damping off* provocado por *Fusarium* spp. em plântulas de soja. As espécies de *Trichoderma* com potencial antagonista também têm sido utilizadas como promotoras de crescimento de plantas e na melhoria da germinação e sanidade de sementes (Ethur *et al.*, 2006). Além disso, esses fungos são capazes de suprimir o desenvolvimento de vários fungos fitopatogênicos e sua atividade como antagonista é influenciada pelo tipo de solo, condições de temperatura e humidade, e, também, pela microflora associada (Howel, 2003). No entanto, sua dinâmica e sobrevivência em solos, cujo sistema de cultivo é o de plantio direto na palha, ainda é pouco estudada, principalmente em lavouras que apresentam zonas compactadas.

A forma de ação de *Trichoderma* como agente de controle biológico pode estar associada à competição por nutrientes, produção de metabólitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas da parede celular, quitinases, proteases e glucanases (Papavizas, 1985; Melo, 1991). Além disso, alguns isolados de *Trichoderma* spp. produzem, *in vitro*, enzimas quitinolíticas e

glucanases que são capazes de degradar a parede celular de alguns fitopatógenos (Elad *et al.*, 1983). A capacidade antagonística de *Trichoderma harzianum* Rifai 1969 ITEM 3636 é superior a de *T. longibrachiatum* Rifai 1969 ITEM 3635 em cultivo de amendoim com histórico de podridão radicular causada por *Fusarium solani* (Rojo *et al.*, 2007). O controle biológico de *damping off* de pré-emergência por isolados de *T. virens* estaria relacionado à sua capacidade de degradar compostos produzidos pela semente e que estimulariam a germinação de propágulos do patógeno (Howell, 2002).

Resultados que contemplem o potencial de controle biológico por isolados de *Trichoderma* spp. advindos de solo compactado ainda são pouco relatados. Além de contribuir com o conhecimento de quais espécies do antagonista habitam esses locais, poderão informar a eficiência desses indivíduos em testes de laboratório, resultando em uma possível indicação para seu uso *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antagonista de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* spp., obtidos de solo compactado, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre plântulas de soja.

## Material e Métodos

### Solo e isolados de *Trichoderma* e *Fusarium*

Amostras de solo foram coletadas em uma área conduzida sob sistema plantio direto na palha localizada no município de Victor Graeff, RS, Brasil. No local, foi realizado previamente um levantamento da condição de compactação do solo, representado por níveis de Resistência a Penetração (Rp, MPa) (Girardelo *et al.*, 2011).

Os isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. (Quadro 1) foram obtidos a partir de diluições seriadas do solo (Carter, 1993), advindo dos pontos de coleta com maiores níveis de Rp. A identificação dos isolados foi realizada, em um estudo anterior (Milanesi, 2012), através de PCR e sequenciamento do gene Fator de Elongação-1 $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ), para *Fusarium* spp., e da região ITS 1 e ITS 2 para *Trichoderma* spp. Estes isolados fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### Teste de pareamento de culturas

Através do teste de cultura pareada (Dennis e Webster, 1971), avaliou-se a ação antagônica de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Fusarium* spp. Um disco

de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), com 12 mm de diâmetro, contendo micélio de *Fusarium* sp. foi transferido para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro), também contendo meio BDA, a 0,5 cm da borda da placa. As placas foram incubadas durante 72 h a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, um disco de meio de cultura BDA com 12 mm de diâmetro, contendo micélio de *Trichoderma* sp., foi transferido para a posição oposta ao disco de micélio de *Fusarium* sp. nas placas de Petri. As placas foram novamente incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. Sete dias após a repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp., foram realizadas medições do diâmetro das colônias do patógeno, com o auxílio de um paquímetro digital, e agrupamento dos isolados do antagonista em classes, conforme a escala proposta por Bell *et al.* (1982). A avaliação da classe de antagonismo foi novamente realizada aos 13 dias após a repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp. O ensaio foi realizado no delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento.

#### Teste *in vivo* de isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. em plântulas de soja

Nesse experimento, foram utilizados cinco isolados de *Trichoderma* sp., sendo quatro de pontos de coleta com média/alta Rp (3,4 e 5,0 MPa) e diferentes profundidades e o isolado ETSR 20 (de solo rizosférico de tomateiro cultivado em estufa) que pertence à coleção de isolados fúngicos do Laboratório de Fitopatologia da UFSM. Este isolado mostrou-se eficiente

no controle de *F. solani* e *F. oxysporum* em tomateiro e pepineiro (Ethur, 2006). Foram utilizados quatro isolados de *Fusarium* sp., a fim de testá-los quanto à capacidade de serem ou não causadores de *damping off* em plântulas de soja (Quadro 1).

Os isolados de *Fusarium* spp. foram cultivados em grãos de milho esterilizados (Klingelfuss *et al.*, 2007). Para isso, os grãos foram embebidos em água durante 24 h e, no dia seguinte, o excesso de água foi drenado. Aproximadamente 150 cm<sup>3</sup> desses grãos foram colocados, separadamente, em frascos Erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, que foram autoclavados por duas vezes, com intervalo de 24 h. Após o resfriamento, foram transferidos para cada frasco, dez discos de meio de cultura, com 12 mm de diâmetro, contendo o micélio do patógeno. Os frascos foram incubados a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante 14 dias. Isolados de *Trichoderma* spp. selecionados para esse estudo foram cultivados em meio de cultura BDA durante 14 dias a 25 °C e fotoperíodo de 12h.

Em câmara climatizada, copos plásticos com capacidade para 200 mL foram preenchidos com substrato (marca Carolina Soil®) esterilizado por duas vezes (120 °C e 1 atm durante uma hora com intervalo de 24 h). Para a inoculação do substrato, 100 g de grãos de milho colonizados por *Fusarium* sp. foram colocados em 500 mL de água destilada esterilizada e a mistura foi batida em liquidificador até a formação de uma suspensão homogênea. Antes da adição da suspensão de *Fusarium* sp., foi medida a quantidade de substrato necessária para cada tratamento sendo o mesmo colocado em bandejas e humedecido com

**Quadro 1** – Isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. utilizados no teste de biocontrole *in vitro* e *in vivo* em plântulas de soja.

Isolado	Rp e profundidade <sup>1</sup>	Espécie	Código de acesso GenBank
F <sub>1s</sub> <sup>2</sup>	3,4 MPa/10-15 cm	<i>Fusarium oxysporum</i> E.F. Sm. & Swingle	- <sup>4</sup>
F <sub>2s</sub>	3,4 MPa/05-10 cm	<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg 1976	-
F <sub>3s</sub>	5 MPa/10-15 cm	<i>Fusarium oxysporum</i> E.F. Sm. & Swingle	-
F <sub>4s</sub>	5 MPa/10-15 cm	<i>Fusarium oxysporum</i> E.F. Sm. & Swingle	-
T <sub>1s</sub>	3,4 MPa/00-05 cm	<i>Trichoderma koningiopsis</i> Samuels, C. Suárez & H.C. Evans 2006	KC155356
T <sub>2s</sub>	3,4 MPa/05-10 cm	<i>Trichoderma tomentosum</i> Bissett 1992	KC155357
T <sub>3s</sub>	3,4 MPa/10-15 cm	<i>Trichoderma koningiopsis</i> Samuels, C. Suárez & H.C. Evans 2006	KC155358
T <sub>4s</sub>	5 MPa/05-10 cm	<i>Trichoderma tomentosum</i> Bissett 1992	KC155359
T <sub>5s</sub> <sup>3</sup>	-	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg 1999	-

<sup>1</sup> Resistência a Penetração (Rp, MPa) e profundidade de coleta. <sup>2</sup> F<sub>3s</sub> ou T<sub>2s</sub>; isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. obtidos de solo (s). <sup>3</sup> Isolado ETSR 20 obtido de solo rizosférico de tomateiro (Ethur, 2006). <sup>4</sup> Sequência ainda não depositada no GenBank.

1 L de água destilada esterilizada e homogeneizado para melhor distribuir a umidade. Em seguida, foi medida a quantidade de suspensão do patógeno, utilizando proveta graduada, suficiente para preencher todos os copos plásticos de cada tratamento, sendo que para cada copo foram colocados 10 mL da suspensão que foi misturada ao substrato. Para determinação da quantidade de inóculo adicionada ao substrato, uma alíquota de cada suspensão foi diluída (Ethur, 2006) e plaqueada em meio de cultura Nash & Snyder, seletivo para *Fusarium* sp., conforme metodologia de diluições seriadas proposta por Carter (1993). Foram contabilizadas  $10^7$  UFCs de *Fusarium* sp.

As unidades experimentais inoculadas com o patógeno, a testemunha absoluta e aquelas preenchidas com substrato para os tratamentos que receberiam somente *Trichoderma* spp. foram acondicionados em sacos plásticos devidamente fechados. Os mesmos foram levados para a câmara de incubação (25 °C e fotoperíodo de 12 h) durante cinco dias. Nos tratamentos testemunha absoluta e somente *Trichoderma* spp. foram adicionados apenas 10 mL de água destilada esterilizada. Após esse período de incubação, foram adicionados 10 mL da suspensão de esporos do antagonista, para cada tratamento, e a mesma foi incorporada ao substrato.

A contagem de UFCs de *Trichoderma* spp. para os isolados utilizados foi feita através de um hemacitômetro. Todas as concentrações foram ajustadas para  $10^8$  esporos/mL. Após a adição do antagonista, os copos foram novamente colocados em sacos plásticos em câmara climatizada. Após três dias de incubação (25 °C e fotoperíodo de 12h) foram feitas covas de semeadura com, aproximadamente, 3 cm de profundidade em que foram depositadas duas sementes de soja (cv. FT-Estrela)/tratamento.

No decorrer do experimento, foi contabilizada a presença ou ausência de sintomas de *damping off* de plântulas/tratamento e, aos 30 dias após a semeadura, foi avaliado o comprimento de raiz (cm) e o peso fresco e seco (g) das plântulas.

### Análise estatística

As médias das notas obtidas no teste de confrontação direta e os dados de comprimento de raiz (cm), peso fresco e peso seco (g), foram submetidas à análise da variância e comparação de médias através do teste de Scott-Knott com 5% de significância, com o auxílio do software Sisvar versão 5.3 (Ferreira, 2000). Os dados de ocorrência de *damping off* foram convertidos para percentagem (%)/tratamento.

## Resultados e Discussão

### Seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. com antagonismo a *Fusarium* sp. em soja

A caracterização do potencial antagonista de espécies de *Trichoderma* é a primeira etapa para avaliação da capacidade de biocontrole desses micro-organismos (Mbarga *et al.*, 2012). Os isolados F1s (*F. oxysporum*), independentemente do isolado de *Trichoderma* spp. utilizado, e F2s (*F. proliferatum*), exceto quando em combinação com o isolado de *Trichoderma* spp. T1s (*T. koningiopsis*) foram os que apresentaram os menores valores médios de crescimento micelial aos sete dias de avaliação (Quadro 2). Para F3s (*F. oxysporum*) não houve redução significativa do crescimento e em F4s (*F. oxysporum*) pode-se observar uma pequena redução que foi dependente do isolado de *Trichoderma* spp. com que foi confrontado. Diferenças no grau de micoparasitismo podem estar associadas ao maior ou menor crescimento micelial de *Fusarium* spp., o que provavelmente é devido às variações na atividade de biocontrole desempenhadas por isolados de *Trichoderma* spp. (Sivan e Chet, 1989).

Em relação à classificação do antagonismo de *Trichoderma* spp., os isolados T2s e T4s, ambos identificados como *T. tomentosum*, foram agrupados na classe 1,0, sendo capazes de crescer sobre todo o patógeno. Esta classificação aplicou-se aos isolados de *Fusarium* sp. F3s e F4s, identificados como *F. oxysporum*. Entretanto, foi observado que o isolado T4s, quando confrontado com F1s (*F. oxysporum*) e F2s (*F. proliferatum*) apresentou uma classificação muito próxima a 1,0 (1,2 e 1,3, respectivamente), o que o tornaria eficiente no biocontrole dessas espécies de *Fusarium*. Esses resultados contrariam os observados por Lopes *et al.* (2012) em que o isolado de *T. tomentosum* 29/11, entre outros avaliados em confrontação direta com *Sclerotinia sclerotiorum*, obteve um score muito baixo entre as classes de antagonismo de Bell *et al.* (1982).

Em uma análise filogenética baseada na região ITS de 170 espécies de *Trichoderma*, observou-se que *T. tomentosum* foi agrupado no clado Harzianum, que inclui *T. harzianum* (Błaszczuk *et al.*, 2011), espécie comumente relacionada ao biocontrole de uma série de patógenos (Harman, 2000; Inam-Ul-Haq *et al.*, 2009; Bomfim *et al.*, 2010; Steindorff *et al.*, 2012). Essa proximidade genética pode ter contribuído para o bom desempenho de *T. tomentosum* como agente de controle biológico, conforme os resultados observados neste trabalho. Contudo, ainda são poucos os relatos dessa espécie e sua utilização no biocontrole de doenças.

**Quadro 2** – Crescimento micelial de *Fusarium* spp. após sete dias em teste de confrontação direta com *Trichoderma* spp. e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme escala de Bell *et al.* (1982) após 13 dias de incubação.

<i>Trichoderma</i> spp. <sup>(1)</sup>	<i>Fusarium</i> spp. <sup>(2)</sup>	Diâmetro médio das colônias de <i>Fusarium</i> spp. (mm) <sup>(3)</sup>	Classificação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. <sup>(4)</sup>
T5s		35,0 <sup>(ns)</sup>	1,8 a
T1s		35,6	1,4 b
T2s	F1s	35,3	1,3 b
T3s		34,8	1,2 b
T4s		33,2	1,2 b
T1s		47,0 a	2,0 a
T3s		32,8 b	1,9 a
T5s	F2s	34,4 b	1,8 a
T2s		33,0 b	1,7 a
T4s		31,6 b	1,3 b
T3s		41,9 <sup>(ns)</sup>	1,9 a
T5s		42,0	1,9 a
T1s	F3s	47,0	1,0 b
T2s		40,5	1,0 b
T4s		41,6	1,0 b
T5s		39,8 b	2,0 a
T1s		48,2 a	1,0 b
T3s	F4s	41,3 b	1,2 b
T2s		38,6 b	1,0 b
T4s		38,4 b	1,0 b
Média <sup>(5)</sup>		38,6	1,4
C.V. (%) <sup>(6)</sup>		19,6	22,9

<sup>(1)</sup> Isolados de *Trichoderma* spp. e respectivas espécies: T1s e T3s: *T. koningiopsis*; T2s e T4s: *T. tomentosum*; e T5s: *T. asperellum*. <sup>(2)</sup> Isolados de *Fusarium* spp. e respectivas espécies: F1s, F3s e F4s: *F. oxysporum*; e F2s: *F. proliferatum*. <sup>(3)</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ); <sup>(ns)</sup> não significativo. <sup>(4)</sup> Classe 1: *Trichoderma* spp. cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* spp. cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio (Adaptado de Carvalho *et al.*, 2011). <sup>(5)</sup> Média geral do crescimento micelial de *Fusarium* spp. e das classes de antagonismo de *Trichoderma* spp. <sup>(6)</sup> Coeficiente de variação (%).

Os demais isolados (T1s, T3s e T5s) apresentaram potencial de antagonismo contra *Fusarium* spp., sendo agrupados dentro da classe 2,0, embora para F1s o isolado T3s tenha ficado dentro da classe 1,0 (média das classificações 1,2) (Quadro 2). Com esses resultados iniciais, pode-se observar que todos os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados podem ser utilizados como agentes de controle biológico contra as espécies de *Fusarium* testadas, pois a maioria das classes de antagonismo ficaram entre 1,0 e 2,0. Os isolados F3s, F4s e F2s diferenciaram-se de F1s por apresentarem maior crescimento micelial (Figura 1). Entretanto, o isolado F1s não diferiu estatisticamente de tratamentos em que *Fusarium* sp. foi combinado com *Trichoderma* spp. (F4s x T1s, F3s x T1s e F2s x T1s). Além disso, os tratamentos com o isolado F1s em combinação com todos isolados de *Trichoderma* spp. testados tiveram os menores cres-

cimentos, assim como as combinações F2s x T2s, F2s x T3s e F2s x T4s. Estes resultados apontam que *in vitro* F1s (*F. oxysporum*) e F2s (*F. proliferatum*) seriam mais facilmente controlados pelos possíveis antagonistas testados.

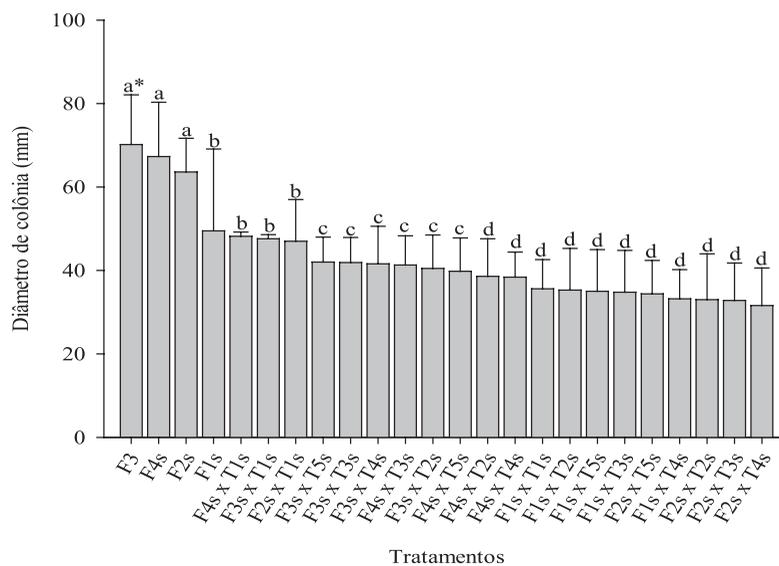
Entre os principais mecanismos envolvidos em testes de biocontrole (como o de confrontação direta) em que *Trichoderma* spp. é utilizado, destacam-se o micoparasitismo (Papavizas, 1985; Harman e Kubicek, 1998; Howell, 2003; Hermosa *et al.*, 2012) e a antibiose (Howell, 1998; Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998; Hermosa *et al.*, 2012). Além disso, verifica-se que fungos do gênero *Trichoderma* são hábeis na produção e liberação de enzimas hidrolíticas o que os auxilia na detecção da presença de outro fungo pela sensibilidade de moléculas liberadas a partir do hospedeiro (planta) por degradação enzimática (Vinale *et al.*, 2008).

### Teste *in vivo* de isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. em plântulas de soja

Os resultados de alguns tratamentos não são apresentados nas figuras em função da elevada incidência de *damping off*, que foi quantificada em porcentagem (%) (Quadro 3).

O tratamento F1s (*F. oxysporum*), isolado ou combinado com *Trichoderma* spp. (F1s x T2s e F1s x T5s) foi o mais agressivo, originando 100% de *damping off*. As combinações F1s x T3s e F1s x T4s também originaram grande incidência da doença, assim como

F4s x T1s e F4s x T3s, todos com 75% de *damping off*. Em comparação aos resultados obtidos no teste de confrontação direta *in vitro*, foi possível destacar algumas diferenças. A combinação F2s x T1s, que obteve um dos maiores crescimentos miceliais (Quadro 2 e Figura 1), foi uma das que apresentou piores resultados *in vivo*, pois teve baixas médias de comprimento de raiz (cm) e peso fresco e seco (g) de plântulas (Figura 2). O isolado F2s (*F. proliferatum*) prejudicou o desenvolvimento de plântulas, o que pode ser comprovado por sua recorrência entre os piores tratamentos *in vivo*.



**Figura 1** – Crescimento micelial de isolados de *Fusarium* spp. utilizados no experimento de biocontrole em soja, após sete dias, em cultivo individual e em teste de confrontação direta com isolados de *Trichoderma* spp. F1s, F3s e F4s: *Fusarium oxysporum*; F2s: *Fusarium proliferatum*; T1s e T3s: *Trichoderma koningiopsis*; T2s e T4s: *Trichoderma tomentosum*; e T5s: *Trichoderma asperellum*.

\*Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o desvio padrão.

**Quadro 3** – *Damping off* (%) de plântulas de soja, cultivar FT-Estrela, em substrato inoculado com isolados de *Fusarium* spp. (F) e *Trichoderma* spp. (T), de forma isolada ou combinada, após 30 dias de cultivo em condições controladas.

Tratamentos <sup>(1)</sup>	<i>Damping off</i> (%)					
	Sem <i>Trichoderma</i> spp. <sup>(2)</sup>	T1s	T2s	T3s	T4s	T5s
Sem <i>Fusarium</i> spp. <sup>(2)</sup>	0	0	0	0	0	0
F1s	100	25	100	75	75	100
F2s	0	25	0	0	0	25
F3s	0	0	0	0	0	100
F4s	75	75	50	75	0	50

<sup>(1)</sup>F1s, F3s e F4s: *Fusarium oxysporum*; F2s: *Fusarium proliferatum*; T1s e T3s: *Trichoderma koningiopsis*; T2s e T4s: *Trichoderma tomentosum*; e T5s: *Trichoderma asperellum* (ETSR 20) <sup>(2)</sup>Testemunha: apenas água estéril, sem *Fusarium* spp. e sem *Trichoderma* spp.

*In vitro*, o isolado F3s (*F. oxysporum*) em combinação com *Trichoderma* spp., não apresentou diferenças quanto ao crescimento micelial, mas *in vivo* sua combinação com o isolado T1s (F3s x T1s) foi uma das melhores, assim como F3s x T2s. O isolado F4s (*F. oxysporum*), tanto no teste *in vitro* quanto *in vivo*, não se destacou.

Não houve *damping off* nos tratamentos Testemunha, apenas suspensão de *Trichoderma* spp. e somente suspensão de *Fusarium* sp. dos isolados F2s e F3s (Quadro 3). Além disso, não foi observado *damping off* em algumas combinações entre esses isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp., tais como F3s combinado com T1s, T2s, T3s e T4s e para o tratamento F4s x T4s.

Com relação a *Trichoderma* spp., os melhores isolados *in vitro* (T2s e T4s) também foram responsáveis por alguns dos resultados mais promissores *in vivo*. Além deles, T1s e T5s, agrupados na classe 2 de antagonismo (Quadro 2), obtiveram destaque para a variável comprimento de raiz (Figura 2). Ainda, o isolado T3s (classe 2 de antagonismo) não foi um dos melhores tratamentos *in vivo*, embora tenha sido eficiente *in vitro* contra o isolado F1s de *Fusarium* sp. Não foi observado *damping off* para as combinações entre o isolado F3s e T1s, T2s, T3s e T4s, tendo esse último se destacado, pois quando combinado com F2s e F4s, não houve incidência da doença (Quadro 3). Combinações envolvendo o isolado T5s (F1s x T5s; F3s x T5s; F2 x T5 e F4 x T5) apresentaram 100, 50 e 25% de *damping off*, respectivamente.

Nos tratamentos em que se realizou a avaliação em plântulas, foi possível observar que embora os isolados de *Trichoderma* spp. tivessem sido aplicados de maneira isolada, algumas combinações entre o antagonista e o patógeno foram capazes de promover um melhor desenvolvimento da plântula. Para a variável comprimento de raiz (cm) (Figura 2), por exemplo, os únicos tratamentos combinados que induziram sua redução foram F2s x T2s, F2s x T1s e F2s x T5s. Os demais não diferiram estatisticamente entre si. Os tratamentos que se destacaram pelo aumento do comprimento de raiz foram T4s, F3s x T1s, T5s, T1s, F1s x T1s, F4s x T4s, F3s x T2s e T2s, em que as médias ficaram acima de 10 cm.

Para o peso fresco de plântulas (Figura 2), os tratamentos F3s x T1s, F3s x T2s e T2s tiveram as melhores médias, acima de 1,2 g, e os tratamentos F4s, F2s, F1s x T3s, F1x T4s, F4s x T1s, F4s x T3s e F1s x T5s foram os que apresentaram as menores médias. O isolado de *Fusarium* sp. F2s, mesmo em combinação com *Trichoderma* spp. (T1s e T5s) foi capaz de prejudicar o desenvolvimento de plântulas. Esse resultado pode ser justificado por possíveis relações antagônicas entre os metabólitos produzidos por ambos os fungos e isso se refletiu sobre o peso fresco das plântulas tratadas

com tais micro-organismos. Em estudo com maracujazeiro e isolados de *Trichoderma* spp. avaliando o enraizamento de estacas, Santos *et al.* (2010) verificaram que os isolados utilizados não promoveram o enraizamento, embora *Trichoderma* spp. tenha incrementado o peso fresco e seco de plantas advindas das estacas.

Na variável peso seco de plântulas de soja, verificou-se que os tratamentos F3s x T1s, T2s, F3s x T2s e T1s foram os melhores, enquanto que F1s x T5s, F4s x T3s, F1s x T4s, F4s x T1s, F1s x T3s, F2s e F4s apresentaram as menores médias. Entre os isolados de *Trichoderma* spp. aplicados de forma isolada, T2s (*T. tomentosum*), obteve destaque com relação ao peso fresco e seco de plântulas. Nesse caso, a habilidade deste isolado poderia ser atribuída a sua capacidade de associação simbiótica com as raízes da plântula que, aliada a sua ação decompositora, disponibilizaria nutrientes prontamente absorvíveis para o vegetal. Além disso, atuando como agente de controle biológico, inibiria a ação do fitopatógeno (no caso *Fusarium* sp.) que pode interferir no desenvolvimento normal da plântula (Santos, 2008).

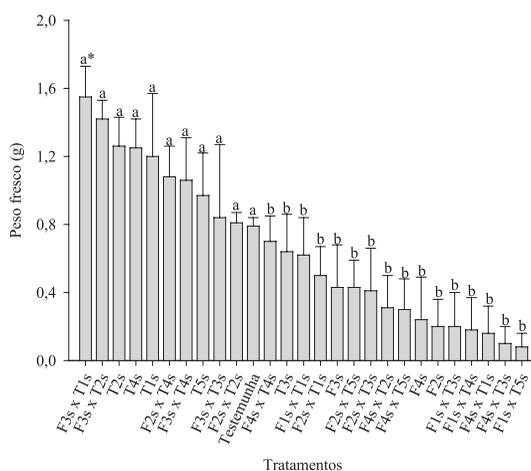
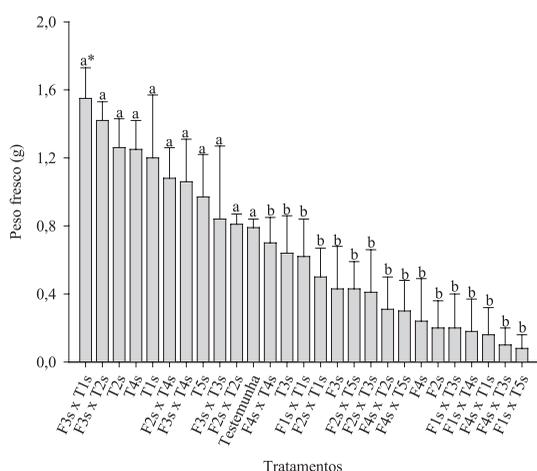
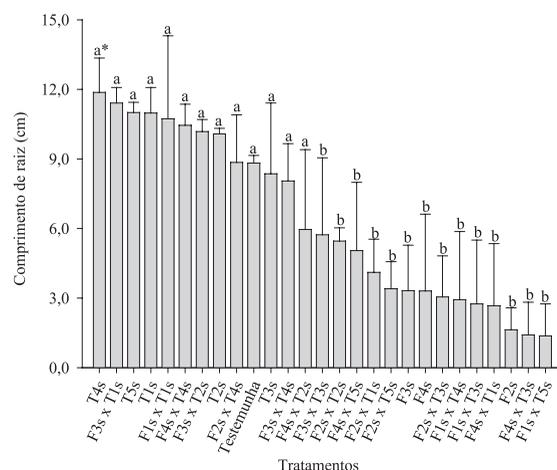
A aplicação de *Trichoderma* spp. pode ser eficiente no controle de *damping off* causado pelo gênero *Fusarium* em plântulas de soja, já que a busca por métodos de manejo de doenças menos agressivos ao meio ambiente têm sido bastante enfatizados nas últimas décadas. Os resultados apresentados neste trabalho apontam que em alguns tratamentos, as quais houve combinação entre *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp., houve percentuais elevados de *damping off*, bem como redução de comprimento de raiz, peso fresco e seco de plântulas. Contudo, a explicação para esses resultados ainda é limitada, visto que até o momento, os processos bioquímicos relacionados ao micoparasitismo foram relatados de uma forma muito fragmentada (Seidl *et al.*, 2009).

## Conclusões

1. Os isolados de *Trichoderma* spp. oriundos de solo compactado (T1s e T3s-*T. koningiopsis*; T2s e T4s-*T. tomentosum*; e T5s-*T. asperellum*) testados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apresentam potencial para controle de *Fusarium* spp. (F1s, F3s e F4s-*F. oxysporum*; F2s-*F. proliferatum*) em soja.

2. Os isolados de *Trichoderma* spp. (T1s, T2s, T3s, T4s e T5s) atuam como promotores de crescimento de plântulas de soja, cv. FT-Estrela, nas condições testadas.

3. As espécies *Fusarium oxysporum* e *Fusarium proliferatum* avaliadas neste estudo são patogênicas para a cultivar de soja FT-Estrela e provocam *damping off* em plântulas nas condições testadas.



**Figura 2** – Comprimento de raiz (cm), peso fresco (g) e peso seco (g) de plântulas de soja, cultivar FT-Estrela, aos 30 dias após semeadura em substrato infestado com isolados de *Fusarium* sp. e *Trichoderma* spp. de forma isolada ou combinada. F1s, F3s e F4s: *Fusarium oxysporum*; F2s: *Fusarium proliferatum*; T1s e T3s: *Trichoderma koningiopsis*; T2s e T4s: *Trichoderma tomentosum*; e T5s: *Trichoderma asperellum* (ETS 20).

\*Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o desvio padrão.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Doutorado para o primeiro autor, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica e aos revisores anônimos pelas importantes sugestões e correções.

## Referências Bibliográficas

Allmaras, R.R.; Kraft, J.M. e Miller, D.E. (1988) - Effects of soil compaction and incorporated crop residue on root health. *Annual Review of Phytopathology*, vol.26, p. 219-243.

Agrios, G.N. (2005) - *Plant Pathology*. 5.<sup>a</sup> ed. Burlington, USA, Elsevier Academic Press, 922p.

Aoki, T.; O'Donnell, K. e Scandiani, M.M. (2005) - Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, vol.46, n.3, p. 162-183.

Aoki, T.; O'Donnell, K.; Homma, Y. e Lattanzi, A.R. (2003) - Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex-*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia*, vol.95, n.4, p. 660-684.

Bell, D.K.; Wells, H.D. e Markham, C.R. (1982) - *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against

- six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, vol.72, n.4, p. 379-382.
- Bettiol, W. e Ghini, R. (1995) - Controle Biológico. In: Bergamin, A.F.; Kimati, H. e Amorin, L. (Eds.) - *Manual de fitopatologia. Vol. 1 - Princípios e Conceitos*. 3.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Agronômica Ceres, p. 717-728.
- Błaszczuk, L.; Popiel, D.; Chełkowski, J.; Koczyk, G.; Samuels, G.J.; Sobieralski, K. e Siwulski, M. (2011) - Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of Applied Genetics*, vol.52, n.2, p. 233-243.
- Bomfim, M.P.; São José, A.R.; Rebouças, T.N.H.; Almeida, S.S.; Souza, I.V.B. e Dias, N.O. (2010) - Avaliação antagonista *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathologica*, vol.36, n.1, p. 61-67.
- Carvalho, D.D.C.; Mello, S.C.M.; Lobo Júnior, M. e Silva, M.C. (2011) - Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. *Tropical Plant Pathology*, vol.36, n.1, p. 28-34.
- Carter, M.R. (Ed.) (1993) - *Soil sampling and methods of analysis*. Boca Raton, USA, Lewis Publishers. 823 p.
- Dennis, C. e Webster, J. (1971) - Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: III - Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*, vol.57, n.DEC, p. 363-369.
- Elad, Y.; Chet, I.; Boyle, P. e Henis, Y. (1983) - Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, vol.73, n.1, p. 85-88.
- Ethur, L.Z.; Rocha, E.K.; Milanesi, P.; Muniz, M.F.B. e Blume, E. (2006) - Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. *Ciência e Natura*, vol.28, n.2, p. 17-27.
- Ethur, L.Z. (2006) - *Dinâmica populacional e ação de Trichoderma no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro*. Tese de doutoramento. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 153 p.
- Ferreira, D.F. (2000) - Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: *Anais da 45<sup>a</sup> Reunião anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria*. São Carlos, Universidade Federal de S. Carlos (UFSCar), p. 255-258.
- Girardello, V.C.; Amado, T.J.C.; Nicoloso, R.S.; Hörbe, T.A.N.; Ferreira, A.O.; Tabaldi, F.M. e Lanza-nova, M.E. (2011) - Alterações nos atributos físicos de um latossolo vermelho sob plantio direto induzidas por diferentes tipos de escarificadores e o rendimento da soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol.35, n.6, p. 2115-2126.
- Harman, G.E.; Kubicek, C.P. (Eds.) (1998) - *Trichoderma and Gliocladium. Vol. 2: Enzymes, biological control and commercial applications*. London, Taylor & Francis. 393 p.
- Harman, G.E. (2000) - Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, vol.84, n.4, p. 377-393.
- Hermosa, R.; Viterbo, A.; Chet, I. e Monte, E. (2012) - Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, vol.158, n.1, p. 17-25.
- Howel, C.R. (2003) - Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, vol.87, n.1, p. 4-10.
- Howell, C.R. (2002) - Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, vol.92, n.2, p. 177-180.
- Howell, C.R. (1998) - The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman, G.E.; Kubicek, C.P. (Eds.) - *Trichoderma and Gliocladium. Vol.2: Enzymes, biological control and commercial applications*. London: Taylor & Francis, p. 173-184.
- Inam-Ul-Haq, M.; Javed, N.; Khan, M.A.; Jaskani, M.J.; Khan, M.M.; Khan, H.U.; Irshad, G. e Gowen, S.R. (2009) - Role of temperature, moisture and *Trichoderma* species on the survival of *Fusarium oxysporum ciceri* in the rainfed areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, vol.41, n.4, p. 1965-1974.
- Klingelfuss, L.H.; Yorinori, J.T. e Destro, D. (2007) - Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, vol.32, n.1, p. 50-55.
- Lopes, F.A.C.; Steindorff, A.S.; Geraldine, A.M.; Brandão, R.S.; Monteiro, V.N.; Lobo Júnior, M.; Coelho, A.S.G.; Ulhoa, C.J. e Silva, R.N. (2012) - Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, vol.116, n.7, p. 815-824.
- Mbarga, J.B.; Ten Hoopen, G.M.; Kuate, J.; Adio-bo, A.; Ngonkeu, M.E.L.; Ambang, Z.; Akoa, A.; Tondje, P.R. e Begoude, B.A.D. (2012) - *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent

- for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*, vol.36, p. 18-22.
- Melo, I.S. (1991) - Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Ed.) - *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna, EMBRAPA – CNPDA. p. 7-23.
- Milanesi, P.M. (2012) - *Aspectos biológicos da interação Fusarium spp. e Trichoderma spp. em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto*. Tese de doutoramento. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 131 p.
- Neto, A.L.F.; Hartman, G.L.; Pedersen, W.L.; Li, S.; Bollero, G.A. e Diers, B.W. (2006) - Irrigation and inoculation treatments that increase the severity of soybean sudden death syndrome in the field. *Crop Science*, vol.46, n.6, p. 2547-2554.
- Palazzini, J.M.; Ramirez, M.L.; Torres, A.M. e Chulze, S.N. (2007) - Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Protection*, vol.26, n.11, p. 1702-1710.
- Papavizas, G.C. (1985) - *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potencial for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, vol.23, p. 23-54.
- Rojo, F.G.; Reynoso, M.M.; Ferez, M.; Chulze, S.N. e Torres, A.M. (2007) - Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection*, vol.26, n.4, p. 549-555.
- Santos, H.A.; Mello, S.C.M. e Peixoto, J.R. (2010) - Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e Ácido Indol-3-Butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. *Bioscience Journal*, vol.26, n.6, p. 966-972.
- Santos, H.A. (2008) - *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum*. Dissertação de mestrado, Brasília, Universidade de Brasília. 94 p.
- Saremi, H.; Burgess, L.W. e Backhouse, D. (1999) - Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, vol.31, n.7, p. 941-947.
- Scandiani, M.M.; Aoki, T.; Luque, A.G.; Carmona, M.A. e O'Donnell, K. (2010) - First report of sexual reproduction by the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae* in nature. *Plant Disease*, vol.94, n.12, p. 1411-1416.
- Seidl, V.; Song, L.; Lindquist, E.; Gruber, S.; Koptchinskiy, A.; Zeilinger, S.; Schmoll, M.; Martínez, P.; Sun, J.; Grigoriev, I.; Herrera-Estrella, A.; Baker, S.E. e Kubicek, C.P. (2009) - Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics* [em linha], vol.10:567. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/567>>.
- Sivasithamparam, K. e Ghisalberti, E.L. (1998) - Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek, C.P. e Harman, G.E. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium. Vol. 1: Basic biology, taxonomy and genetics*. London, CRC Press, p. 139-191.
- Sivan, A. e Chet, I. (1989) - Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*, vol.135, n. 675-682.
- Steindorff, A.S.; Silva, R.N.; Coelho, A.S.G.; Nagata, T.; Noronha, E.F. e Ulhoa, C.J. (2012) - *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. *Biological Control*, vol.61, n.2, p. 134-140.
- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.; Marra, R.; Woo, S.L. e Lorito, M. (2008) - *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, vol.40, n.1, p. 1-10.
- Wakelin, S.A.; Warren, R.A.; Kong, L. e Harvey, P.R. (2008) - Management factors affecting size and structure of soil *Fusarium* communities under irrigated maize in Australia. *Applied Soil Ecology*, vol.39, n.2, p. 201-209.
- Woo, S.L.; Scala, F.; Ruocco, M. e Lorito, M. (2005) - The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, vol.96, n.2, p. 181-185.