



UFSM

Tese de Doutorado

**CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E MOLECULAR, E
SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA BIOCONTROLE DE
Fusarium sp. EM CRISÂNTEMO**

Josiane Pacheco Menezes

PPGA

Santa Maria, RS, Brasil

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E MOLECULAR, E
SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA BIOCONTROLE DE
Fusarium sp. EM CRISÂNTEMO**

TESE DE DOUTORADO

Josiane Pacheco Menezes

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E MOLECULAR, E SELEÇÃO
DE *Trichoderma* spp. PARA BIOCONTROLE DE *Fusarium* sp. EM
CRISÂNTEMO**

por

Josiane Pacheco Menezes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de
Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor
em Agronomia**.

Orientadora: Prof^a. PhD. Elena Blume

Santa Maria, RS, Brasil

2007

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E MOLECULAR, E SELEÇÃO
DE *Trichoderma* spp. PARA BIOCONTROLE DE *Fusarium* sp. EM
CRISÂNTEMO**

elaborada por

Josiane Pacheco Menezes

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

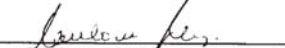
COMISSÃO EXAMINADORA



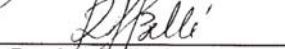
Elena Blume, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



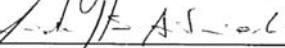
Rute Teresinha da Silva Ribeiro, Dr. (UCS)



Marlove Fátima Brião Muniz, Dr. (UFSM)



Rogério Bellé, Dr. (UFSM)



Zaida Inês Antonioli, PhD. (UFSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007.

Dedico este trabalho à minha filha Gabrielli, ao meu companheiro Fabrício, aos meus pais Neusa e Josias, ao meu irmão Fábio e minha tia Eunice.

“ Meu time do coração ”

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Professora Elena Blume pelos ensinamentos, amizade e orientação.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFSM, aos professores, funcionários e Colegiado pela oportunidade.

Aos Professores Rogério Bellé, Marlove Muniz, Zaida Inês Antonioli, Maria Estér Pereira, Marcelo Antônio Rodrigues pelo apoio e ajuda exemplar na execução deste projeto.

Ao produtor e professor Carlos Maciel pela oportunidade, disponibilidade e incrível sabedoria. E também aos funcionários Vanderlei e Baiano, obrigado.

À amiga e laboratorista Maria Nevis Weber, aos funcionários – Mari, Fernando e Angelita - e aos professores do Departamento de Defesa Fitossanitária, obrigado por tudo.

Às bolsistas e amigas Josiane Leila da Cruz e Clarice Manzoni pela amizade e ajuda responsável durante a execução deste trabalho.

Aos amigos e fiéis escudeiros do Grupo de Controle Biológico Emanuele Junges, Paola Milanesi, Johnathan Rodrigues, Daniele Pedroso, Maria Georgina Flores, Simone Brand, Cleidionara Pacheco e, também, aos colaboradores Cristiane Godoy, Alexandre Guimarães, Cícero Nicolini, Daniel Tonet, Miria e Fábio – muito obrigado.

Ao funcionário do CCR Wilceu, obrigado.

Aos colegas e amigos do curso, especialmente, Luciana Zago Ethur, Daniela Stefanelo, Geovana Gomez, Igor Poletto, Rodrigo de Camargo e Augusto Murari meu agradecimento sincero.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia do Solo e Ambiente – Manoele Lupatini, Daniel Waldow, Ricardo Steffen, Gerusa Kist e Andréa Hentz – obrigado pela amizade e trabalho responsável.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Toxicológica – Luiz, Aline, Carine, Jucélia, Tânia e Guilherme – muito obrigado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular (LabDros), obrigado.

Ao “Comitê de Apoio” – meus pais Neusa e Josias, meu companheiro Fabrício, meu irmão Fábio, minha cunhada Laila, minha tia Eunice e minha filha Gabrielli – meu terno e eterno agradecimento!!

E, a todos amigos e familiares que contribuíram direta ou indiretamente, obrigado pelo apoio, carinho e incentivo!!

“Pode parecer uma honra ser condecorado ou receber uma comenda. Porém, nada brilha tanto quanto a radiância da vida daqueles que têm vivido cada dia com uma sincera atitude e boas intenções, tanto na vida profissional como na particular.”

Mensagem budista

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E MOLECULAR, E SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA BIOCONTROLE DE *Fusarium* sp. EM CRISÂNTEMO

AUTORA: JOSIANE PACHECO MENEZES

ORIENTADORA: ELENA BLUME

Data e local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007.

Trichoderma spp. Persson é um dos fungos mais pesquisados como agente de biocontrole de doenças, sendo antagonista a vários fitopatógenos em diferentes culturas. O patógeno de solo *Fusarium oxysporum* Link causador de murcha vascular em várias culturas, inclusive em crisântemo, é de difícil controle, devido principalmente à sua capacidade de sobrevivência no solo por longos períodos, mesmo sem a presença do hospedeiro. Estudos sobre a dinâmica populacional de *Trichoderma* spp. e de *Fusarium* spp. e da microbiota nativa associada são necessários, em especial, para observar-se o impacto da adição de biocontroladores no solo. Plantas ornamentais, como o crisântemo, são cultivadas no Rio Grande do Sul, mas são suscetíveis a várias doenças, dentre as quais, a murcha por *Fusarium* tem se destacado, principalmente, em ambiente protegido. Visando o biocontrole da murcha vascular causada por *F. oxysporum* em crisântemo, bem como, o entendimento da dinâmica populacional da microbiota nesse patossistema, este trabalho teve por objetivos: estudar a dinâmica da população fúngica presente em solo utilizado no cultivo de crisântemo em estufa na presença e ausência de sintomas de murcha; selecionar e identificar isolados de *Fusarium* patogênicos ao crisântemo; isolar e selecionar antagonistas, do gênero *Trichoderma*, eficazes no biocontrole de *Fusarium oxysporum* em teste *in vitro*; verificar a eficácia *in vivo* dos antagonistas testados no controle *in vitro* de *F. oxysporum*; avaliar a sobrevivência de *Trichoderma* sp. em substrato com incorporação de biopreparados desse fungo; analisar a dinâmica populacional de *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. presentes em solo esterilizado e povoado com bioprotetores utilizados no cultivo de crisântemo em ambiente protegido; caracterizar molecularmente os isolados de *Trichoderma* sp. utilizados no biocontrole do patógeno; avaliar o efeito de administrações de *Trichoderma* sp. em organismos não-alvo. A amostragem de solo cultivado com crisântemo em estufa mostrou variação nas populações fúngicas de *Trichoderma* sp. e de *Fusarium* sp., em função da ocorrência de sintomas de murcha nas plantas. Dos isolados de *Fusarium* sp. inoculados, 25,3% foram patogênicos ao crisântemo, os quais foram amostrados em pontos com sintomas visíveis da doença nas plantas. Os biopreparados de *Trichoderma* sp. utilizados variaram em sua eficácia no controle da murcha do crisântemo, podendo atingir 100% de biocontrole como no caso do isolado UFSMT15.1. A desinfestação do solo com brometo de metila

reduziu a população de *Trichoderma*, *Fusarium* e outros gêneros fúngicos. A incorporação do biopreparado no solo promoveu crescimento populacional de *Trichoderma* sp. e inibiu o crescimento de *Fusarium* sp. A caracterização molecular dos isolados de *Trichoderma* indicou que a região do ITS dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp. apresenta uma banda simples com um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases e o isolado UFSMT17 possui alta similaridade filogenética com a espécie *Trichoderma aureoviride*. Nos ratos tratados com o biopreparado de *Trichoderma* sp. ativo, não foram encontrados conídios viáveis do fungo nos tecidos amostrados após uma hora da administração do bioproduto.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*, bioproteção, patogenicidade, sobrevivência, organismo não-alvo e espaço interno transcrito.

ABSTRACT

Doctorate Thesis
 Program of Pos-Graduation in Agronomy
 Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**POPULATIONAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION, AND SELECTION OF
Trichoderma spp. FOR BIOCONTROL OF *Fusarium* sp. IN CHRYSANTHEMUM**

AUTHOR: JOSIANE PACHECO MENEZES

ADVISER: ELENA BLUME

Date and location of Presentation: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007.

Trichoderma spp. is one of the most researched fungi as biocontrol agent of diseases, being antagonistic to several phytopathogens in different crops. The soilborne pathogen *Fusarium oxysporum* causes wilt in several crops, including chrysanthemum, is of difficult control, due mainly to its survival capacity in the soil for long periods, even without the presence of the host. Studies about the population dynamics of *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. and of the associated native microbiota they necessary, especially, to observe the impact of the biocontrols addition in the soil. Ornamental plants, such chrysanthemum, are cultivated in Rio Grande do Sul, but they are susceptible to several diseases, among them, the wilt of *Fusarium oxysporum*, mainly in protected environment. Aiming at the biocontrol of the wilt caused by *F. oxysporum* in chrysanthemum, as well as the understanding of the population dynamics of the microbiota in this patossystem, this work had for objectives: to study the dynamics of the fungic population present in soil used in the chrysanthemum cultivation in greenhouse in presence and ausence of wilt symptoms; to select and identify isolates of *Fusarium* pathogenic to chrysanthemum; to isolate and select antagonists, of the gender *Trichoderma*, effective in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* *in vitro*; to verify, *in vivo*, the effectiveness of the antagonists tested *in vitro* in control of *F. oxysporum*; to evaluate the survival of *Trichoderma* sp. in substract with the incorporation of biological products of the fungus; to analyze the population dynamics of *Fusarium* sp. and *Trichoderma* sp. in sterilized soil and with addition of bioprotector; to identify the isolates of *Trichoderma* sp. used in the biocontrol of the pathogen; to evaluate the effect of administrations of *Trichoderma* sp. in non-target organisms. The soil sampling cultivated with chrysanthemum in greenhouse showed variation in the fungic populations of *Trichoderma* sp. and *Fusarium* sp. as a function of the occurrence of wilt symptoms in plants. Of the isolates of *Fusarium* sp. inoculated, 25,3% were pathogenic to chrysanthemum, which were found at points with visible symptoms of the disease on the plants. The biological products of *Trichoderma* sp. used varied in their effectiveness in the control of the wilt of chrysanthemum, being able to reach 100% of biocontrol as in the case of isolate UFSMT15.1. The desinfestation of the soil with methyl bromide reduced the population of *Trichoderma*, *Fusarium* and other fungi. The incorporation of the biological products in the soil promoted population growth of *Trichoderma* sp. and inhibited the growth of *Fusarium* sp. The molecular characterization of the isolates of *Trichoderma* indicated that the region of ITS of isolates UFSMT15.1, UFSMT16 and UFSMT17 of *Trichoderma* sp. it presents a simple band with a fragment of approximately 600 bp and the isolate UFSMT17

present high phylogenetic similarity with the specie *Trichoderma aureoviride*. In the rats treated with biological product of active *Trichoderma* sp., no viable spores of the fungus werw found in the sampled tissues after a hour of the administration of the bioproduct.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, bioprotection, pathogenicity, survival, non-target organism and internal space transcribed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Localização do município de Itaara, onde se encontra a estufa utilizada neste experimento. Santa Maria, RS, 2005.....	28
Figura 1.2- Croqui da estufa com 6 lotes e 24 canteiros.....	29
Figura 1.3- Pontos de coleta de amostras de solo nos lotes 1 a 6 (canteiros de 1 a 24) com e sem presença de murcha por <i>Fusarium</i> sp.....	30
Figura 1.4- Ocorrência de <i>Trichoderma</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. e outros gêneros fúngicos nos canteiros 1 a 24 (Lotes 1 a 6). Santa Maria, RS, 2005.....	36
Figura 2.1- Incidência e biocontrole da murcha causada por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>chrysanthemi</i> em crisântemo cv. Calábria por diferentes pós biológicos. Santa Maria, RS, 2006.....	61
Figura 2.2- Severidade da murcha, causada por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>chrysanthemi</i> , em crisântemo cv. Calábria em diferentes tratamentos com pós biológicos a base de <i>Trichoderma</i> sp. Santa Maria, RS, 2006.....	62
Figura 3.1- Localização do município de Itaara, onde se encontra a estufa utilizada neste experimento. Santa Maria, RS, 2005.....	75
Figura 3.2- Croqui da estufa com indicação dos lotes.....	76
Figura 3.3- Diversidade de fungos em amostras de solo antes (A) e depois (B) da desinfestação. Santa Maria, RS, 2005.....	79
Figura 3.4- Número de UFC/g de solo de <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp. presentes em solo tratado com diferentes doses (0, 2, 4 e 6g) de biopreparado a base de <i>Trichoderma</i> . Santa Maria, RS, Julho de 2005.....	80
Figura 3.5- Número de UFC/g de solo de <i>Trichoderma</i> sp. e outros gêneros fúngicos presentes em solo tratado com diferentes doses (0, 2, 4 e 6g) de biopreparado a base de <i>Trichoderma</i> . Santa Maria, RS, Julho de 2005.....	81

Figura 3.6- Média mensal de temperatura (1 = Maio, 2 = Junho e 3 = Julho). Santa Maria, RS, 2005.....	82
Figura 3.7- Média mensal de umidade relativa (1 = Maio, 2 = Junho e 3 = Julho). Santa Maria, RS, 2005.....	82
Figura 3.8- Média de temperatura do solo à 5 cm de profundidade e medida às 9:00h (1 = Maio, 2 = Junho e 3 = Julho). Santa Maria, RS, 2005.....	83
Figura 4.1- Representação esquemática da organização dos genes ribossomais (rDNA) em fungos. A posição dos iniciadores utilizados para amplificar e seqüenciar o rDNA de gêneros fúngicos estão indicadas. O gene ribossomal 5.8S RNA nesse grupo de organismos está localizado na região ITS.....	86
Figura 4.2- Produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da digestão enzimática com Hae III, Hinf I e Mbo I, respectivamente, dos isolados UFSMT17, UFSMT16 e UFSMT15.1 de <i>Trichoderma</i> sp. e Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco (M). Santa Maria, RS, 2006.....	100
Figura 4.3- Produto da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos isolados UFSMT17, UFSMT16 e UFSMT15.1 de <i>Trichoderma</i> sp. M - Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco. Santa Maria, RS, 2006.....	101
Figura 4.4- Sequência molecular do isolado UFSMT16 de <i>Trichoderma</i> sp. da região do ITS (Internal Transcript Spacer). Nucleotídeos sublinhados representam a região do 5.8S.....	102
Figura 4.5- Sequência molecular do isolado UFSMT17 de <i>Trichoderma</i> sp. da região do ITS (Internal Transcript Spacer). Nucleotídeos sublinhados representam a região do 5.8S.....	102
Figura 4.6- Múltiplo alinhamento das sequências da região do ITS dos isolados UFSMT16 e UFSMT17 de <i>Trichoderma</i> sp. (Ponto (.) indica que o nucleotídeo é igual à seqüência majoritária (consenso) e Traço (-) representa uma inserção ou deleção de nucleotídeo). Santa Maria, RS, 2006.....	103
Figura 4.7- Dendograma das distâncias genéticas entre UFSMT16,	105

UFSMT17 e isolados de <i>Trichoderma</i> sp. provenientes do Banco de Dados do NCBI BLAST (Tabela 5.2). Santa Maria, RS, 2006.....	
Figura 4.8- Representação esquemática do gel quando utilizadas as seqüências dos isolados AF055213* (<i>T. harzianum</i>), UFSMT16 e UFSMT17 após digestão do fragmento de DNA da região do Espaço Interno Transcrito (ITS) com as enzimas de restrição Hae III, Hinf I e Mbo I. M – Representação esquemática do marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco. *Nº de acesso no NCBI BLAST	107
Figura 1- Administração da solução de pó biológico do isolado UFSMT17 de <i>Trichoderma</i> sp. via oral através de sonda gástrica. Santa Maria, RS, 2006.....	120
Figura 2- A) Rato anestesiado com algodão embebido em clorofórmio e submetidos à necropsia. B) Sangue sendo punsionado do coração com auxílio de seringa heparinizada de 5 mL. Santa Maria, RS, 2006.....	121
Figura 4- A) Conídios (esporos) de <i>Trichoderma</i> sp. corados com corante Panótico utilizado na coloração de células sanguíneas (Aumento 100X). B) Células sanguíneas (roxas e maiores) e conídios de <i>Trichoderma</i> sp. (azul) corados com corante Panótico (Aumento 400X).....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo) e percentual de ocorrência dos gêneros fúngicos encontrados em 30 amostras de solo coletadas em estufa com cultivo de crisântemo. Santa Maria, RS, 2005.....	34
Tabela 1.2- Ocorrência (%) de gêneros fúngicos em 30 pontos de coleta de amostras de solo em estufa cultivada com crisântemo. Santa Maria, RS, 2005.....	37
Tabela 1.3- Incidência (%) e severidade da murcha causada por isolados de <i>Fusarium</i> sp. patogênicos ao crisântemo. Santa Maria, RS, 2005.....	41
Tabela 2.1- Tratamentos utilizados no teste de biocontrole da murcha por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>chrysanthemi</i> em crisântemo (cv. Calabria). Santa Maria, RS, 2006.....	56
Tabela 2.2- Teste de confronto direto entre <i>F. oxysporum</i> e isolados de <i>Trichoderma</i> sp. Santa Maria, RS, 2006.....	60
Tabela 2.3- Altura, número de folhas e inflorescências e massa seca de raiz de plantas de crisântemo (cv. Calabria) tratadas com pós biológicos de <i>Trichoderma</i> sp. Santa Maria, RS, 2006.....	63
Tabela 2.4- Número de unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo) de <i>Trichoderma</i> sp. encontradas nos seis tratamentos. Santa Maria, RS, 2006.....	65
Tabela 3.1- Número de UFC de <i>Trichoderma</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. e outros gêneros fúngicos /g de solo nos meses de maio, junho e julho. Santa Maria, RS, 2005.....	69
Tabela 4.1- Enzimas de restrição e seus sítios de reconhecimento e clivagem utilizados na digestão do DNA dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de <i>Trichoderma</i> sp. Santa Maria, RS, 2006..	95
Tabela 5.2- Organismo e número de acesso dos isolados fúngicos utilizados na comparação de similaridade genética. Santa Maria, RS, 2006.....	98

Tabela 1- Tratamentos utilizados no teste de toxicologia do biopreparado de <i>Trichoderma</i> sp. (UFSMT17) administrado em ratos. Santa Maria, RS, 2006.....	119
Tabela 2- Número de UFC/mL de <i>Trichoderma</i> sp. e outros gêneros fúngicos encontradas nos tecidos de ratos tratados com biopreparado deste fungo. Santa Maria, RS, 2006.....	124

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- TOXICOLOGIA DO BIOPROTETOR A BASE DE <i>Trichoderma</i> sp. (ISOLADO UFSMT17) ADMINISTRADO EM MAMÍFERO.....	115
Anexo 2- Meio de Cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).....	130
Anexo 3- Meio de Cultura Meio de cultura seletivo para <i>Trichoderma</i> ..	130
Anexo 4- Meio de cultura Nash-Snyder (NS).....	131
Anexo 5- Meio de cultura Folha-de Cravo (FCA ou CLA).....	131
Anexo 6- Meio de cultura Bata-Dextrose (BD).....	132

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Análise de solo realizada pelo Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Solos / CCR / UFSM	133
--	-----

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	16
LISTA DE ANEXOS.....	18
LISTA DE APÊNDICES	19
INTRODUÇÃO.....	22
CAPÍTULO I – DISTRIBUIÇÃO DE <i>Trichoderma</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. E OUTROS GÊNEROS FÚNGICOS PRESENTES EM SOLO CULTIVADO COM CRISÂNTEMO EM ESTUFA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> sp. AO CRISÂNTEMO.....	25
1.1- Introdução	26
1.2- Material e Métodos	29
1.3- Resultados e Discussão.....	35
1.4- Conclusões	43
1.5- Referências Bibliográficas	44
CAPÍTULO II– CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>chrysanthemi</i> COM PÓS BIOLÓGICOS DE <i>Trichoderma</i> sp. E CONCENTRAÇÃO DE <i>Trichoderma</i> sp. EM SUBSTRATO COMERCIAL.....	50
2.1- Introdução	51
2.2- Material e Métodos	53
2.3- Resultados e Discussão.....	60
2.4- Conclusões	67
2.5- Referências Bibliográficas	68
CAPÍTULO III – PRESENÇA DE <i>Trichoderma</i> sp. E <i>Fusarium</i> sp. NO CULTIVO DE CRISÂNTEMO EM SOLO SUBMETIDO À ESTERILIZAÇÃO E COM ADIÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp.....	72

3.1- Introdução	73
3.2- Material e Métodos	76
3.3- Resultados e Discussão.....	80
3.4- Conclusões	86
3.5- Referências Bibliográficas	87
CAPÍTULO IV – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS) DO rDNA DOS ISOLADOS UFSMT15.1, UFSMT16 E UFSMT17 DE <i>Trichoderma sp.</i>.....	91
4.1- Introdução	92
4.2- Material e Métodos	94
4.3- Resultados e Discussão.....	100
4.4- Conclusões	109
4.5- Referências Bibliográficas	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS	113

INTRODUÇÃO

O mercado de ornamentais, no Brasil, movimenta cerca de 1,5 bilhões de dólares por ano. Da área total cultivada com ornamentais, mudas e plantas ornamentais representam 50,4% da área total, flores de corte, 28,8%, flores em vaso, 13,2%, folhagem em vaso, 3,1%, folhagem de corte, 2,6%, e outros produtos, 1,9%.

Na floricultura, o crisântemo é a segunda espécie mais cultivada para corte no país, com uma produção estimada de 30 milhões de hastes/ano. O crisântemo de corte é uma das flores mais comercializadas devido à grande diversidade em cores e formas de inflorescências, à durabilidade das mesmas e ao preço acessível ao consumidor.

O sistema de produção do crisântemo, inclusive de outras plantas ornamentais, é largamente caracterizado pelo cultivo protegido, o qual, se não manejado adequadamente, favorece o aparecimento de doenças. No Rio Grande do Sul, o cultivo de crisântemo em ambiente protegido tem crescido de forma significativa, entretanto, um dos principais problemas que tem limitado sua produção são os danos decorrentes da murcha vascular causada por *Fusarium* spp. Link, especialmente, *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*.

Fusarium sp. é um fungo cosmopolita e um importante componente da microflora, podendo ser encontrado em solos naturais ou cultivados, onde pode permanecer por longo tempo sob a forma saprofítica, sobrevivendo no material orgânico do solo. As plantas atacadas por esse fungo apresentam redução no crescimento e aparecimento de folhas com aspecto queimado, de cor marrom na base das plantas, além de murcha generalizada e morte, dependendo da cultivar.

O manejo de doenças causadas por patógenos de solo, como *Fusarium* sp., é um contínuo desafio para os produtores e pesquisadores, uma vez que a complexidade estrutural, física e biológica do solo, no qual os patógenos interagem com as raízes das plantas, limita a viabilidade do controle de doenças causadas por esses fitopatógenos.

Diante desse cenário, o controle biológico de patógenos de solo tem ganhado ênfase, uma vez que a introdução de antagonistas, tanto no solo quanto nos órgãos

de propagação tem trazido resultados positivos no biocontrole de doenças. Diversos microrganismos têm revelado potencial antagônico a diferentes fitopatógenos, principalmente a fungos habitantes do solo, como *Fusarium* sp. Entre os biocontroladores utilizados contra patógenos do solo destaca-se *Trichoderma* spp. Persson, o qual é um fungo de vida livre, saprófita, ubíquo e interativo na raiz, solo e filoplano. Estas espécies produzem antibióticos e parasitam outros fungos, competem por nutrientes, espaço e exudatos das raízes, importantes para a germinação dos propágulos dos fungos fitopatogênicos. Além disso, inibem ou degradam enzimas essenciais durante o processo de infecção das plantas pelos patógenos.

Trichoderma é um fungo natural do solo que tem sido estudado no sentido de aumentar sua densidade de inóculo através da utilização de práticas agrícolas ou pela introdução massal direta no solo.

Além dos conhecidos efeitos de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de plantas, tem sido recentemente observado que, certas linhagens de *Trichoderma* podem ter um efeito estimulatório direto no crescimento vegetal. Estes fungos têm-se destacado como agentes promotores de crescimento em plantas, germinação de sementes e produção de flores. Respostas à aplicação de *Trichoderma* spp. são caracterizadas por aumentos significativos na percentagem de germinação, no peso seco e na altura de plantas. Entre outras vantagens, algumas espécies de *Trichoderma* tornaram-se resistentes a fungicidas quando expostos a estes, onde linhagens resistentes e antagônicas a um patógeno particular podem ser empregadas juntamente com fungicidas para controle de outras doenças.

Assim, o controle biológico pode ser uma alternativa viável para o controle de patógenos de solo no cultivo de crisântemo e vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, à especificidade e ao desenvolvimento da resistência, podendo ainda, promover o crescimento de plantas.

No entanto, apesar de pesquisas com isolados de *Trichoderma* spp. terem demonstrado sua habilidade em controlar doenças em várias culturas de importância agrônômica e florestal, o nível de eficácia nos trabalhos a campo tem sido menor que o esperado. Tal fato demanda estudos sobre a dinâmica populacional desses antagonistas nos patossistemas, bem como, a adequada obtenção e seleção de antagonistas, priorizando espécies hábeis em competir e persistir no ambiente.

Paralelamente, também são necessárias avaliações do risco ecotoxicológico dos antagonistas utilizados no biocontrole de doenças, devido à carência de informações sobre a natureza e magnitude dos impactos ecológicos e na saúde humana da utilização de bioprotetores, como *Trichoderma* sp.

Portanto, diante do exposto em relação ao patossistema “*Fusarium* sp., crisântemo, microbiota associada e ambiente” o presente trabalho teve por objetivos:

- Realizar um levantamento da população fúngica presente em solo utilizado no cultivo de crisântemo em estufa;
- Selecionar e identificar isolados de *Fusarium* patogênicos e não-patogênicos ao crisântemo.
- Isolar e selecionar antagonistas, do gênero *Trichoderma*, eficazes no biocontrole *Fusarium oxysporum* em teste *in vitro*.
- Verificar a eficácia *in vivo*, em crisântemo, dos antagonistas eficazes no controle *in vitro* de *F. oxysporum*.
- Avaliar a sobrevivência de *Trichoderma* sp. em substrato com incorporação de biopreparados desse fungo.
- Analisar a dinâmica populacional de *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. em solo cultivado com crisântemo em ambiente protegido e submetido à desinfestação.
- Caracterizar a região do ITS (Espaço Interno Transcrito) do rDNA dos isolados de *Trichoderma* sp. utilizados no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*.
- Avaliar o efeito de administrações de *Trichoderma* sp. em organismos não-alvo.

CAPÍTULO I

DISTRIBUIÇÃO DE GÊNEROS FÚNGICOS PRESENTES EM SOLO CULTIVADO COM CRISÂNTEMO EM ESTUFA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* sp. À CULTURA

RESUMO

Fungos como *Trichoderma* Persson e *Fusarium* Link fazem parte da microbiota do solo e são alvos de pesquisas sobre suas ações como agente de biocontrole e fitopatógeno, respectivamente. Porém, pesquisas que visam conhecer a distribuição de patógenos de solo e seus possíveis antagonistas são escassas, principalmente, no cultivo de plantas ornamentais, como o crisântemo. Nesse contexto, este trabalho teve por objetivos estudar a ocorrência de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma* presentes em solo cultivado com crisântemo em estufa, identificar os isolados de *Fusarium* patogênicos a essa cultura, bem como elencar isolados de *Trichoderma* sp. com potencial antagônico a esse patógeno. Foram coletadas amostras de solo de estufa com produção comercial de crisântemo de áreas com e sem sintomas de murcha, para a avaliação da presença de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Fusarium* e outros. Realizou-se diluição serial das amostras e contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo). No teste de patogenicidade, utilizaram-se mudas de crisântemo da cv. Calabria e os isolados de *Fusarium* sp. foram inoculados via método do palito. Após 45 dias, as mudas foram avaliadas quanto à incidência e severidade da murcha vascular causada por *Fusarium* sp. A severidade foi avaliada segundo escala de notas de 1 a 9. Em todos os pontos amostrados, foram encontrados isolados de *Trichoderma* sp. Já, *Fusarium* sp. foi encontrado em 90% das amostras, sendo que sua ausência foi observada em pontos sem sintoma visível da doença. Dos gêneros fúngicos encontrados, destacam-se *Trichoderma* sp. com $2,43 \times 10^4$ UFC/g de solo (28,7%), *Penicillium* sp. com $1,87 \times 10^4$ UFC/g de solo (22,1%) e *Fusarium* sp. com $1,46 \times 10^4$ UFC/g de solo (17,2%). Além desses, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Rhizopus* sp. também foram encontrados, perfazendo 31,9% de ocorrência.

Dezenove isolados de *Fusarium* sp. foram patogênicos ao crisântemo (25,3%). Desses, dois isolados (F6A e F7.1A) foram capazes de infectar 75% das plantas, apresentando severidade com nota 7,7 e 7,0 respectivamente. A amostragem de solo cultivado com crisântemo em estufa mostrou variação na população fúngica e os isolados de *Fusarium* sp. patogênicos ao crisântemo foram encontrados em pontos com sintomas visíveis da doença.

Palavras-chaves: levantamento, fungos, crisântemo e patogenicidade.

1.1- INTRODUÇÃO

O crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) representa um dos principais produtos comercializados no setor da floricultura, sendo, economicamente, um dos mais relevantes tanto como flor de corte quanto de vaso. Isso devido, principalmente, à diversidade de formas e cores das inflorescências, à resistência ao transporte e à excelente durabilidade no vaso (OKUYAMA & SAITO, 1992; SCHMIDT, 2001; IBRAFLOR, 2002; BARBOSA, 2005; BRACKMANN, et al., 2006).

No entanto, um dos principais problemas que limita a produção de crisântemo, na região central do estado, são os danos causados por *Fusarium* sp., agente causal de murcha vascular (MENEZES, 2003). Esse fitopatógeno raramente é suprimido através do controle químico, pois dificilmente é erradicado devido à sua capacidade de sobreviver no solo através de estruturas de resistência, os clamidósporos (LARANJEIRA, 2001).

Fusarium Link é um dos gêneros de fungos mais importantes com várias espécies capazes de causar doenças em plantas, sendo comuns as podridões de raízes, caules e frutos, além das murchas vasculares. O gênero possui ampla distribuição geográfica, com representativa ocorrência em todas as regiões do mundo (LARANJEIRA, 2001; POLETTTO et al., 2006). Algumas espécies são particularmente comuns no solo, onde podem persistir sob a forma de clamidósporos ou como hifas, enquanto que outras espécies produzem conídios disseminados pelo

ar, colonizando normalmente ramos, folhas, inflorescências e frutos (EDEL, 1997; VENTURA, 1999).

Segundo Burgess et al. (1997), o gênero *Fusarium* exibe alto grau de biodiversidade com respeito a atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos. Assim, não é surpreendente que representantes desse gênero ocorram na maioria dos nichos ecológicos da maioria das regiões geográficas do mundo.

O controle de fitopatógenos de solo, como *Fusarium* sp., pode ser alcançado através de práticas de manejo que visam favorecer antagonistas nativos e também através da introdução de microrganismos selecionados. Assim, muitos fungos, como *Trichoderma* sp. Persson inibem fitopatógenos através da competição por nutrientes, do parasitismo direto e da produção de metabólitos secundários (enzimas líticas e antibióticos) (MELO, 1991; MARTINS-CORDER & MELO, 1998; MELO & AZEVEDO, 2000; HOWEL, 2003 e 2006; HARMAN, 2006). Além disso, segundo Silva-Ribeiro (2005), espécies de *Trichoderma*, através de suas enzimas, são capazes de inibir ou degradar enzimas essenciais durante o processo de infecção das plantas pelos patógenos. Entre os biocontroladores usados contra fitopatógenos do solo, espécies de *Trichoderma* tem-se destacado (REIS et al., 1995).

Fungos como *Trichoderma* e *Fusarium* fazem parte da microbiota do solo e são alvos de pesquisas sobre suas ações como agente de biocontrole e fitopatógeno, respectivamente. Estudos referentes à distribuição de *Fusarium* concentram-se em grandes culturas, como soja e trigo (FREITAS, 2003). Segundo RUPE et al. (1999), a maior concentração de propágulos de *Fusarium* spp. foi encontrada em até 15 cm de profundidade, em solo infestado naturalmente com o patógeno. Em relação à *Trichoderma*, pesquisas mostram sua ocorrência na rizosfera de algumas culturas como citros (GESHEVA, 2002), batata (TSAHOURIDOU & THANASSOULOPOULOS, 2002), algodoeiro (SIVAN & CHET, 1989) e tomateiro (LARKIN & FRAVEL, 1998). No entanto, nenhum desses estudos comparou a distribuição desses fungos entre áreas com e sem a presença de sintomas de doença radicular.

De acordo com Saremi (1999), as práticas culturais podem influenciar a sobrevivência de patógenos no solo e os fatores climáticos, edáficos e de cobertura vegetal são determinantes na distribuição de *Fusarium* spp. Além disso, sabe-se que, nos mais variados patossistemas, as populações de microrganismos apresentam comportamento dinâmico, e a regulação dessas populações depende

das interações entre indivíduos e destes com o ambiente. Porém, pesquisas que visam conhecer a distribuição de patógenos de solo, como *Fusarium* spp. e seus possíveis antagonistas são poucas, principalmente, no cultivo de plantas ornamentais em ambiente protegido, como o crisântemo.

O conhecimento de gêneros fúngicos presentes no solo utilizado nos mais variados cultivos reflete a situação de um determinado patossistema, uma vez que a presença de sintomas visíveis nas plantas são indícios da presença e ação dos fitopatógenos. A resposta de um vegetal ao ataque de um patógeno é variável e muitas vezes semelhante à reações provocadas por outros agentes não infecciosos. Esse fato faz com que a diagnose de uma doença infecciosa seja uma tarefa árdua, requerendo um conhecimento bastante sólido das interferências que uma planta ou população de plantas pode estar sujeita em um determinado ambiente (SALGADO, 1995). Contudo, levantamentos de gêneros fúngicos, bem como, testes de patogenicidade são importantes na compreensão das relações patógeno-hospedeiro-ambiente. E, ainda, o conhecimento da distribuição de isolados patogênicos e de isolados antagonistas é uma ferramenta essencial nos estudos de biocontrole de doenças, uma vez que fungos antagonistas podem ser coletados em pontos sem a ocorrência de doença, indicando maior probabilidade de ocorrência de antagonistas.

Assim, este trabalho teve por objetivos estudar a ocorrência de fungos, em especial *Fusarium* e *Trichoderma* presentes em áreas com e sem sintoma de murcha em solo cultivado com crisântemo em estufa, bem como, identificar os isolados de *Fusarium* patogênicos a essa cultura.

1.2- MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados em uma estufa com produção comercial de crisântemo de propriedade de Carlos Maciel no município de Itaara (RS) (Figura 1.1) e no Laboratório de Fitopatologia e Câmara de Crescimento do Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

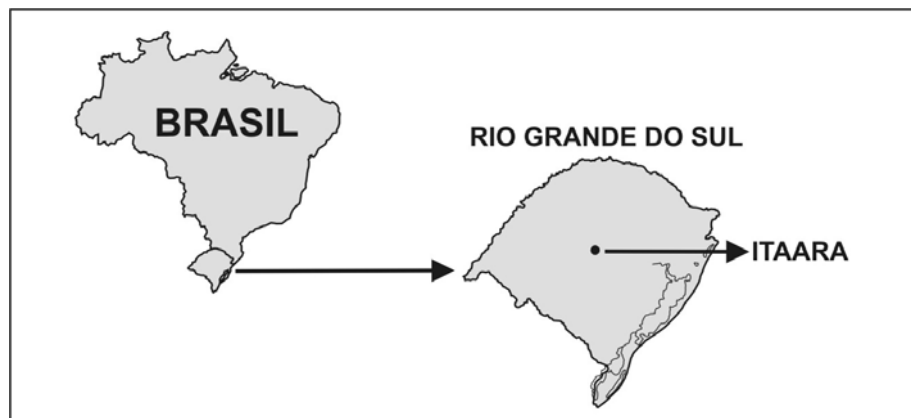


Figura 1.1- Localização do município de Itaara, onde se encontra a estufa utilizada neste experimento. Santa Maria, RS, 2005.

1.2.1- Distribuição de *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. e outros gêneros fúngicos

1.2.1.1- Local das coletas

A coleta de solo foi realizada em estufa comercial localizada no município de Itaara (RS) em março de 2005. A escolha desse local foi devido à alta incidência de doenças, principalmente murcha por *Fusarium* nessa propriedade. Este trabalho foi realizado em uma estufa com área de 600 m² (30 m x 20 m), pé direito de 3 m, estrutura de madeira e coberta com filme de PVC transparente.

1.2.1.2- Levantamento e avaliação dos gêneros fúngicos

Foram coletadas 30 amostras de solo com aproximadamente 500 g, na profundidade de 0 a 10 cm, distribuídas em seis lotes e 24 canteiros (Figura 1.2).

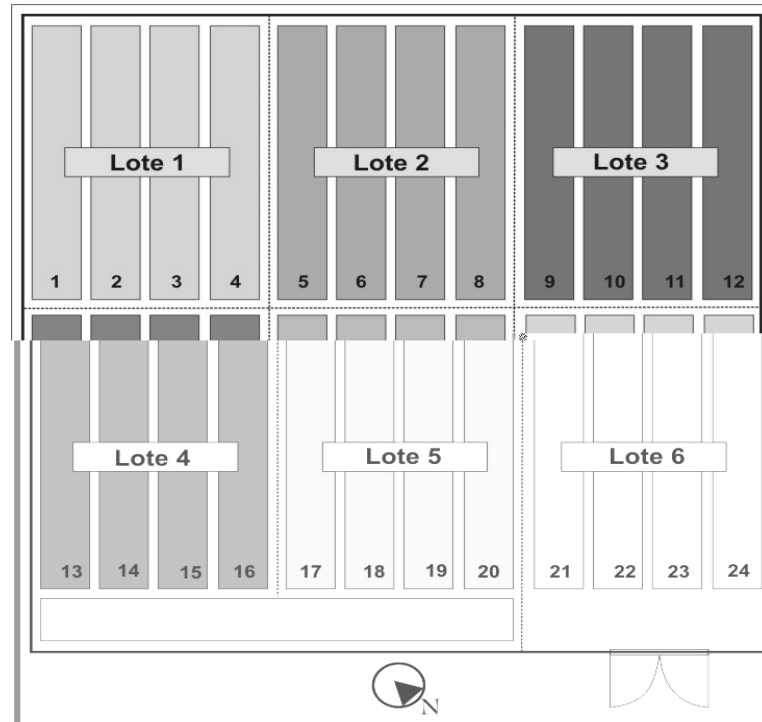


Figura 1.2- Croqui da estufa com 6 lotes e 24 canteiros. Santa Maria, RS, 2005.

Os pontos de coleta foram selecionados em função da presença e ausência de sintomas de murcha vascular por *Fusarium* nas plantas de crisântemo, uma vez que a ausência de sintomas da doença pode ser um indicativo do biocontrole do fitopatógeno pela microbiota do solo ou, ainda, da ausência deste no ponto amostrado (Figura 1.3). O conhecimento da distribuição e proporção da população fúngica auxilia no controle biológico de doenças, pois visa a seleção de antagonistas, como *Trichoderma* sp., com potencial antagonístico a esse fitopatógeno.

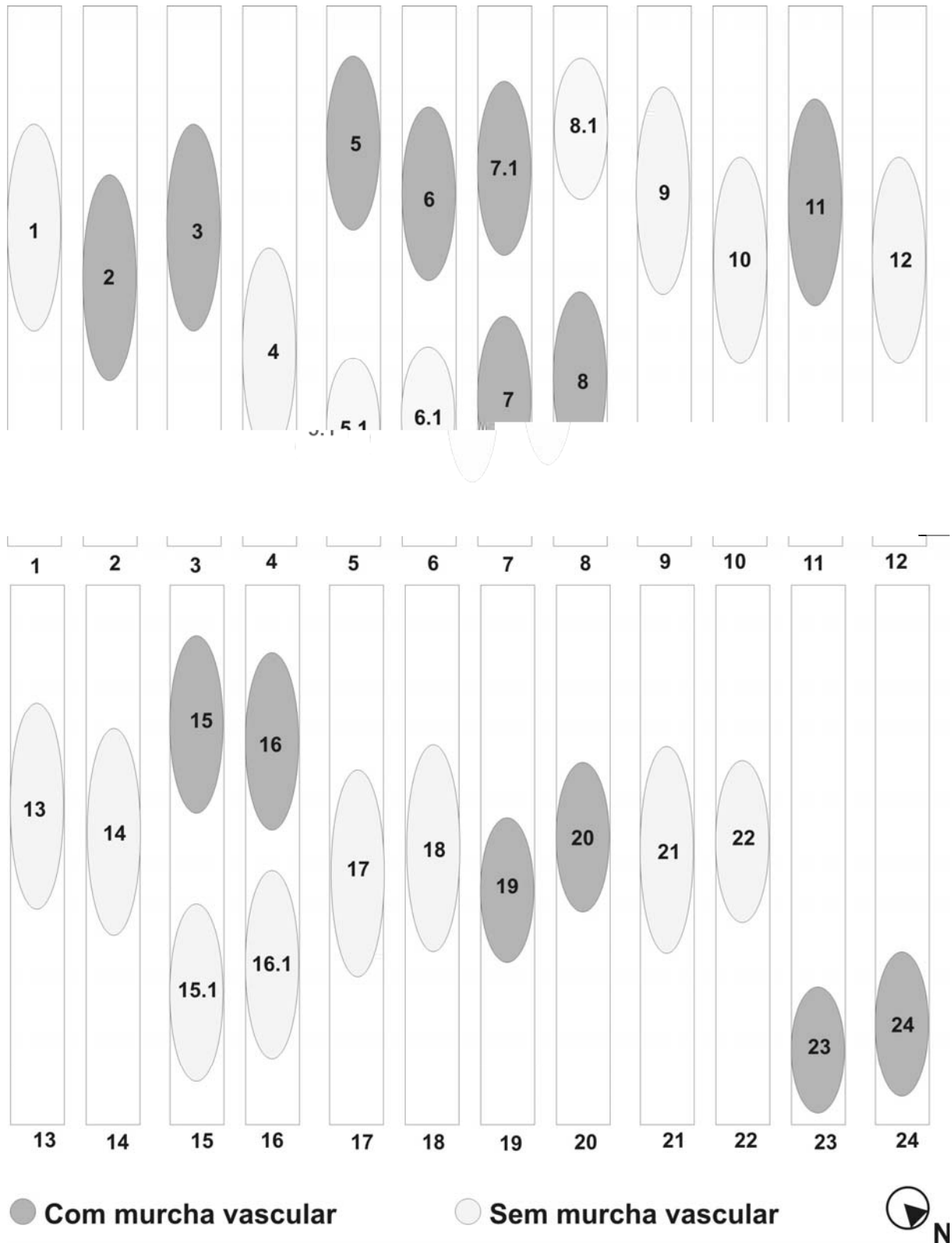


Figura 1.3- Pontos de coleta de amostras de solo nos lotes 1 a 6 (canteiros de 1 a 24) com e sem presença de murcha por *Fusarium* sp.

No momento da coleta, os canteiros estavam sendo utilizados no cultivo de crisântemo e as amostras de solo foram coletadas com auxílio de uma pá de jardinagem (Modelo Padrão – Tramontina 9 x 14 cm), acondicionadas em sacos plásticos de 1L e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia. Entre cada amostragem, a pá foi lavada, por cinco minutos, em solução com hipoclorito 75% por e água corrente.

Para a avaliação da presença de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Fusarium* e outros, dez gramas de solo de cada ponto amostrado foram suspensos, separadamente, em 90 mL de água destilada esterilizada e agitados por 10 minutos em agitador do tipo Fisher – Flexa Mix (USA).

Em quatro repetições, 1 mL da diluição 10^{-2} foi transferido para placas de Petri contendo os meios de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), seletivo para *Trichoderma* (MST) e Nash-Snyder (NS) (Anexos 2, 3 e 4). Após incubação por quatro dias a 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas, os fungos presentes nas placas foram quantificados e identificados, em nível de gênero, através de microscópio estereoscópico e ótico, com base em bibliografia especializada (BARNETT & HUNTER, 1999). Além disso, o número de unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo) foi obtido através da média do número de colônias encontradas nas placas. Utilizaram-se as equações $FD = D_i \times D_s \times Q$ (FD = Fator de diluição, D_i = diluição inicial, D_s = diluições subseqüentes, e Q = volume de solução plaqueado) e $UFC = 1 / FD \times n$ (UFC = número de unidades formadoras de colônias, FD = Fator de diluição, e n = número de colônias encontradas na placa) (CARTER, 1993).

Para a obtenção de culturas axênicas, os isolados de *Trichoderma* e *Fusarium* foram, respectivamente, repicados para placas de Petri contendo os meios de cultura seletivos para cada um desses gêneros. Posteriormente, para a conservação de cada isolado de *Trichoderma* e *Fusarium*, dois discos de meio de cultura com 12mm de diâmetro, contendo micélio desses fungos, foram acondicionados dentro de frascos de vidro contendo água destilada esterilizada, os quais foram vedados com parafilme e mantidos sob refrigeração a 5°C .

1.2.1.3- Análise de solo

Os teores de matéria orgânica, cálcio, magnésio, ferro, manganês, argila e pH foram analisados de acordo com a metodologia de Tedesco et al. (1995) no Laboratório de Análises de Solo do Departamento de Solos – CCR – UFSM.

A análise da umidade das amostras de solo foi realizada no Laboratório de Fitopatologia e foi obtida a partir da metodologia utilizada pela EMBRAPA (1997).

1.2.2- Patogenicidade dos isolados de *Fusarium* ao crisântemo

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e Câmara de Crescimento do DFS – UFSM, utilizando-se 75 isolados de *Fusarium* sp.

1.2.2.1- Preparo das mudas de crisântemo

As mudas utilizadas foram da cultivar Calabria (já enraizadas), uma vez que essa cultivar é uma das mais produzidas no estado, além de ser uma das mais suscetíveis à murcha por *Fusarium* (MENEZES, 2003).

No transplante das mudas, utilizou-se substrato comercial (Plantmax-HA®) em sacos plásticos pretos de 1 L. Foi transplantada uma muda por saco em quatro repetições, no delineamento inteiramente casualizado. As mudas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura média de 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 12 horas e umidade de aproximadamente 70-80%.

1.2.2.2- Produção do inóculo

Para o preparo do inóculo, segundo Costa (1997), placas de Petri, contendo meio de cultura NS receberam aproximadamente 30 pontas de palito-de-dente esterilizadas e com 10 mm de comprimento. As placas foram inoculadas com os

isolados de *Fusarium* através de repicagem de micélio proveniente de placas contendo os isolados do fungo, e incubadas em câmara de crescimento durante 10 dias a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas, para promover a colonização dos palitos pelo fungo.

1.2.2.3- Teste de Patogenicidade

Sete dias após o transplante das mudas, o patógeno (*Fusarium* spp.) foi inoculado nas mudas de crisântemo pelo Método do Palito (GASPERI, 2000). Os isolados de *Fusarium* sp. foram inoculados nas plantas mediante a introdução, no colo de cada muda, de uma ponta de palito colonizada pelo fungo. Dez plantas controle foram utilizadas, as quais foram inoculadas com palitos-de-dente esterilizados e não colonizados. Após 45 dias, as mudas foram avaliadas quanto à incidência e severidade da murcha vascular causada por *Fusarium* sp. A severidade foi avaliada segundo escala de notas variando de 1 a 9, relacionada com a presença de sintomas visíveis na parte aérea, como o aparecimento de folhas com aspecto queimado, de cor marrom, na base das plantas; folhas torcidas, cloróticas e/ou murchas; e planta morta. De acordo com a percentagem de sintomas visíveis da parte aérea, utilizou-se: 1= ausência de sintomas; 3 = menos que 10% da planta com sintoma; 5 = entre 10 e 50% da planta com sintoma; 7 = mais de 50% da planta com sintoma; e 9 = planta morta (FREITAS, 2003).

1.2.2.4- Análise estatística do teste de patogenicidade

Neste teste, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os dados referentes à patogenicidade dos isolados de *Fusarium* sp. foram submetidos à análise da variância com a transformação Raiz ($X + 100$). Para comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a 1% de probabilidade através do programa estatístico SANEST (ZONTA et al., 1984).

1.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1- Distribuição de *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. e outros gêneros fúngicos

A análise das amostras de solo, mostrou a formação de um padrão de ocorrência de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Trichoderma* e outros ao longo da estufa em função da presença e ausência de sintomas da doença nas plantas.

Em todos os pontos amostrados foram encontrados isolados de *Trichoderma* sp. Já, *Fusarium* sp. foi encontrado em 90% das amostras, sendo que sua ausência foi observada em pontos sem sintoma visível da doença (pontos 9, 10 e 13). Dos gêneros fúngicos encontrados, destacaram-se *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. Além desses, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Rhizopus* sp. também foram encontrados, perfazendo 31,99% de ocorrência (Tabela 1.1).

Tabela 1.1- Unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo) e percentual de ocorrência dos gêneros fúngicos encontrados em 30 amostras de solo coletadas em estufa com cultivo de crisântemo. Santa Maria, RS, 2005.

Gêneros	UFC/g de solo	Ocorrência (%)
<i>Trichoderma</i> sp.	$2,43 \times 10^4$	28,69
<i>Penicillium</i> sp.	$1,87 \times 10^4$	22,08
<i>Fusarium</i> sp.	$1,46 \times 10^4$	17,24
<i>Aspergillus</i> sp.	$7,5 \times 10^3$	8,86
<i>Cladosporium</i> sp.	$8,1 \times 10^3$	9,56
<i>Rhizopus</i> sp.	$2,9 \times 10^3$	3,42
<i>Rhizoctonia</i> sp.	$8,6 \times 10^3$	10,15

No que se refere aos gêneros fúngicos encontrados nas amostras de solo, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e *Rhizopus* sp. não são considerados fitopatogênicos ao crisântemo (IMENES & ALEXANDRE, 1995;

HORST & NELSON, 1997; GRUSZYNSKI, 2001; IBRAFLOR, 2002). Porém, podem ser encontrados associados aos fungos fitopatogênicos à esta cultura, atuando como fungos oportunistas, os quais colonizam a planta após a instalação da doença. Já, *Rhizoctonia* sp. é agente causal de damping-off ou podridão de estacas, causando apodrecimento de raízes ou da base dos talos, principalmente, na fase de enraizamento (GRUSZYNSKI, 2001).

De acordo com MELO (2000), o controle biológico de fitopatógenos pode ser alcançado através de práticas de manejo para favorecer antagonistas nativos e também através da introdução de microrganismos selecionados. Neste caso, estratégias de isolamento de um eficiente agente de biocontrole devem ser adotadas. Nesse contexto, a abundância de isolados de *Trichoderma* sp. coletados, em especial, nos pontos com ausência da doença (pontos 9, 10 e 13) (Figuras 1.3 e 1.4 e Tabela 1.2), reforça a importância de levantamentos sobre a biota do solo, bem como, de testes de biocontrole *in vitro* dos isolados obtidos. Em contrapartida, nos pontos 6, 7.1, 11, 14, 15.1, 20 e 21, a ocorrência de *Fusarium* spp. foi maior que a de *Trichoderma* sp. Porém, nos pontos 14, 15.1 e 21, não se observaram plantas doentes. Tal fato sugere a ocorrência, nesses pontos, de isolados de *Fusarium* sp. não patogênicos ao crisântemo, os quais podem, inclusive, ser antagonistas dos isolados patogênicos.

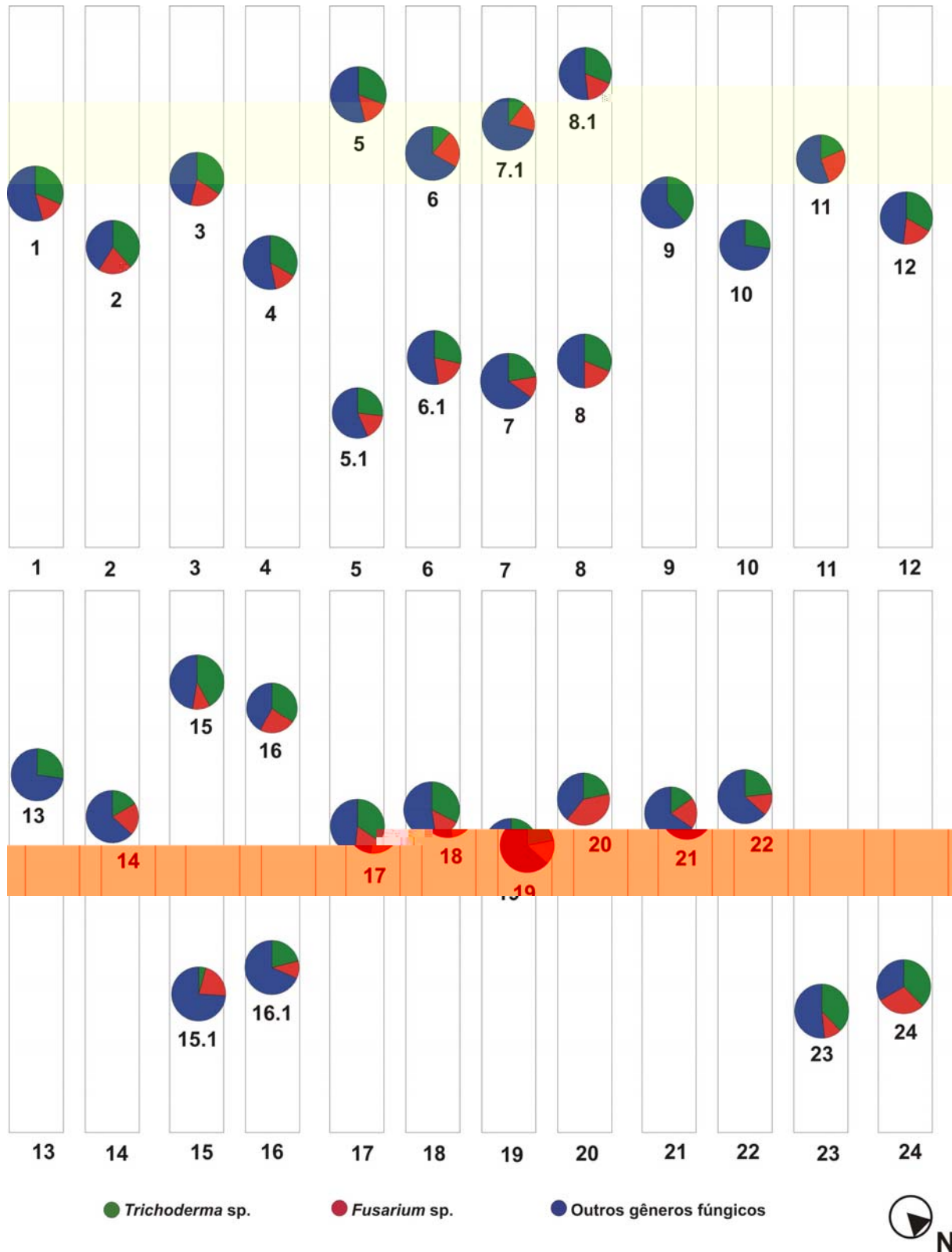


Figura 1.4- Ocorrência de *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. e outros gêneros fúngicos nos canteiros 1 a 24 (Lotes 1 a 6). Santa Maria, RS, 2005.

Tabela 1.2- Ocorrência (%) de gêneros fúngicos e de sintomas de murcha em 30 pontos de coleta de amostras de solo em estufa cultivada com crisântemo. Santa Maria, RS, 2005.

Pontos	Ocorrência (%)			Sintomas*	Cultivares	Umidade (%)
	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	Outros gêneros			
1	31,43	14,28	54,29	-	Sheena	15
2	38,23	20,59	41,18	+	D. Flamengo	18
3	34,61	19,23	46,16	+	L. Bright	17
4	33,33	13,33	53,34	-	L. Bright	15
5	30,27	15,38	53,84	+	D. Flamengo	25
5.1	26,66	16,66	56,67	-	D. Flamengo	27
6	11,11	22,22	66,67	+	L. Bright	23
6.1	28,57	19,05	52,38	-	L. Bright	21
7	22,50	12,50	65,00	+	Sheena	25
7.1	10,53	18,42	71,05	+	Calabria	24
8	31,25	18,75	50,00	+	W. Polaris	26
8.1	31,03	17,24	51,73	-	R. Reagan	25
9	38,23	0,0	61,76	-	B. Repin	14
10	27,27	0,0	72,73	-	Sheena	10
11	18,52	25,92	55,55	+	L. Bright	15
12	33,33	18,52	48,15	-	D. Flamengo	15
13	27,27	0,0	72,73	-	L. Bright	11
14	16,66	20,00	63,34	-	B. Repin	15
15	42,10	10,53	47,37	+	Calabria	16
15.1	4,35	21,74	73,91	-	D. Flamengo	16
16	34,61	23,08	42,31	+	W. Polaris	21
16.1	21,05	10,53	68,42	-	D. Flamengo	12
17	34,48	17,24	48,28	-	B. Repin	13
18	32,50	15,00	52,50	-	Sheena	13
19	21,87	14,81	63,31	+	L. Bright	14
20	21,74	39,13	39,13	+	L. Bright	15
21	15,38	19,23	65,39	-	D. Flamengo	15
22	23,33	13,33	63,34	-	G. Polaris	13
23	37,93	10,34	51,72	+	Sheena	19
24	37,50	29,12	33,33	+	Sheena	18

* (-) Sem sintoma e (+) com sintoma da doença no ponto amostrado.

Na análise de solo dos pontos amostrados (Apêndice A), observou-se que em relação aos teores de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e ferro (Fe) houve diferença entre os pontos com e sem doença. Nos pontos s coaomares dmurcha nareplantas,em

teor de umidade, embora Danielson & Davey (1973) tenham observado que certas linhagens de *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* são adaptadas às condições de umidade excessiva do solo. Além disso, altos teores de umidade do solo associados à temperatura alta (de 27 a 32°C), são fatores condicionantes para o desenvolvimento de doenças, como a murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum* (HORST & NELSON, 1997).

Observou-se também diferença de pH, sendo de 5,7 nos pontos sem doença e 6,1 nos pontos com murcha vascular. De acordo com Melo (1996), o pH do solo pode interferir no parasitismo, sendo que fungos do gênero *Trichoderma* e *Gliocladium* são geralmente favorecidos por solos ácidos, e segundo o autor, o parasitismo de *Armillaria mellea* por *Trichoderma* spp. foi substancialmente reduzido ajustando-se o pH para 5,1, e em pH 7,0 o parasitismo foi inibido. Segundo Chet & Baker (1981), baixos valores de pH aumentam a propagação de fungos, e de *Trichoderma* em especial, sugerindo que a acidificação do solo pode induzir a supressividade de fitopatógenos.

Em relação à matéria orgânica (MO), observou-se pouca diferença, sendo que o solo com presença da murcha apresentou teor de 2,6%, enquanto que no solo sem doença foi de 2,4%. O uso de matéria orgânica tanto incorporada ao solo, quanto empregada como cobertura e como veículo de agentes de biocontrole, contribui no controle dos patógenos pelo estímulo da atividade microbiana e melhora das características físicas e químicas do solo (CASALE et al., 1995; HOITINK & BOHEM, 1999; LEONI & GHINI, 2003).

No que se refere às cultivares de crisântemo presentes nos pontos amostrados, pode-se observar que, nos pontos com sintomas visíveis da doença, estavam sendo cultivadas as variedades Dark Flamengo, Lamit Bright, Sheena, Calábria e White Polaris. É importante considerar que existem poucas informações sobre a reação de cultivares de crisântemo à murcha causada por *F. oxysporum*, havendo a necessidade de um maior conhecimento, especialmente, em relação às cultivares produzidas no Brasil e no Estado. Entretanto, das cultivares acima citadas, Calábria mostra-se extremamente suscetível a este patógeno (MENEZES, 2003).

Segundo Gruszynski (2001), *F. oxysporum* pode manifestar-se de forma diferente entre as cultivares de crisântemo e nem sempre levar a planta à morte, podendo provocar redução no crescimento e aparecimento de folhas com aspecto queimado, de cor marrom na base das plantas.

Fisher & Tousson (1981) ressaltam que a ocorrência e severidade de sintomas específicos da murcha dependem, primariamente, da interação entre a cultivar, o solo e a temperatura. Segundo Horst & Nelson (1997), o padrão de sintoma desenvolvido nas cultivares, principalmente as utilizadas no hemisfério norte, também varia, os sintomas aparecem, inicialmente, no ápice da planta em algumas cultivares, como Yellow Delaware, Bravo e Orange Bowl, enquanto que em outras cultivares, como Royal Trophy e Illini Trophy, os sintomas ocorrem, inicialmente, na base da planta e depois progredem ascendentemente, semelhante à maioria das murchas vasculares causadas por *Fusarium oxysporum*. Outras cultivares, como Mandalay podem desenvolver sintomas iniciais de clorose e murcha foliares, mas estes sintomas desaparecem e a planta continua a crescer, produzindo flores.

1.3.2- Patogenicidade dos isolados de *Fusarium* ao crisântemo

Dos 75 isolados de *Fusarium* sp. inoculados nas mudas, 19 foram patogênicos ao crisântemo (25,33%). Destes, apenas dois isolados (F6A e F7.1A) foram capazes de atacar 75% das plantas, apresentando severidade com nota 7,7 e 7, respectivamente.

Dos isolados patogênicos, quatro isolados (21,05%) apresentaram incidência de 50%, com nota média de 7. O restante (68,42%) apresentou 25% de incidência de murcha, com nota média de 7,15 (Tabela 1.3).

Tabela 1.3- Incidência (%) e severidade da murcha causada por isolados de *Fusarium* sp. patogênicos ao crisântemo. Santa Maria, RS, 2005.

Isolado	Murcha	
	Incidência (%)	Severidade
F6A ⁺⁺	75 a *	7,7
F7.1A	75 a	7
F6B	50 b	7
F5A	50 b	7
F7.1B	50 b	8
F8.1B	50 b	7
F7B	25 c	9
F5C	25 c	7
F6C	25 c	7
F7.1C	25 c	7
F8A	25 c	7
F8C	25 c	9
F8E	25 c	7
F6E	25 c	9
F11A	25 c	7
F8.1D	25 c	5
F11A	25 c	7
F12A	25 c	5
F15B	25 c	7
Controle	0 d	-

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey (CV = 25%).

⁺⁺ F = Isolado de *Fusarium* sp.; Número (5, 6, 7, 7.1, 8, ...) = número do ponto de coleta da amostra de solo; e Letra maiúscula (A, B, C, D e E) = mais de um isolado de *Fusarium* sp. no mesmo ponto de coleta de solo.

Os isolados de *Fusarium* patogênicos ao crisântemo foram obtidos nos pontos onde se observaram sintomas característicos de murcha vascular nas plantas, indicando relação entre a ocorrência de sintomas nas plantas e a virulência dos isolados encontrados nesses pontos.

De acordo com Gruszynski (2001), *F. oxysporum* manifesta-se de forma diferente entre as cultivares de crisântemo e nem sempre leva a planta à morte, podendo provocar redução no crescimento e aparecimento de folhas com aspecto queimado, de cor marrom na base das plantas. A sintomatologia e a reação de diferentes cultivares de crisântemo à murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* são variáveis. Além disso, Menezes (2003) observou diferenças na resposta de 15 cultivares de crisântemo inoculadas com esse fitopatógeno.

Neste teste, apesar de ter sido utilizada uma das cultivares mais suscetíveis a *F. oxysporum*, observou-se diferença na virulência dos 19 isolados patogênicos ao crisântemo. Os dois isolados mais virulentos foram obtidos em pontos com alta incidência e elevada severidade da doença durante os ciclos de produção (Pontos 6 e 7.1 - Figura 1.4).

1.4- CONCLUSÕES

- Existe variação nas populações fúngicas de *Trichoderma* sp. e de *Fusarium* sp. em áreas com e sem sintomas de murcha em solo cultivado com crisântemo em estufa.
- Os isolados de *Fusarium* sp. patogênicos ao crisântemo são encontrados em áreas com sintomas visíveis da doença nas plantas.
- Severidade e incidência elevadas de murcha vascular são observadas por poucos isolados de *Fusarium* sp. obtidos de solo cultivado com crisântemo.

1.5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, J. G. **Cultivo de crisântemo para corte - Informe Agropecuário**, Belo Horizonte : EPAMIG, v. 26, n. 227, p. 36-43, 2005.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BRACKMANN, A.; BELLÉ, R. A.; de FREITAS, S. T.; MELLO, A. M. Qualidade pós-colheita de crisântemos (*Dendranthema grandiflora*) mantidos em soluções de ácido giberélico. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1451-1455. 2005.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BACKHOUSE, D. et al. Biodiversity and population studies on *Fusarium*. In: LOGRIECO, A.; SEIFERT, K. A.; LESLIE, J. F. A. et al. Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species. **Sydowia**, v. 30, p. 1-11. 1997.

CARTER, M. R. (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 631 p.

CASALE, W. L.; MINASSIAN, V., MENGE, J. A., LOVATT, C. J., POND, E., JOHNSON, E. & GUILLEMET, F. Urban and agricultural wastes for use as mulches on avocado and citrus and for delivery of microbial biocontrol agents. **Journal of Horticultural Science**, v. 70, p. 315-352. 1995.

CHET, I.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressiveness to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 71, p. 286-290. 1981.

COSTA, C. L. **Variabilidade morfológica e patológica de isolados de *Fusarium solani* associados à podridão vermelha da raiz (PVR) da soja**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). 1997. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1997.

DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. **Soil Biological Biochemistry**, v. 5, p. 485-494. 1973.

EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. **Phytopathology**, v. 84, p.693-697. 1997.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de Métodos de Análise de Solo**. v. 1. Rio de Janeiro, 1997.

FISHER, N. L.; TOUSSON, T. A. Symptomatology and colonization of chrysanthemum infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. (Abstr.) **Phytopathology**, v. 71, p. 874, 1981.

FREITAS, T. M. Q. **Dano, dinâmica populacional e fontes de resistência genética a *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

GASPERI, A. C. **Variabilidade de isolados, reação de cultivares e danos causados por *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2000, 91f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de passo Fundo, Passo Fundo, 2000.

GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, p. 85-88. 2002.

GRUSZYNSKI, C. **Produção comercial de crisântemos: vaso, corte e jardim**. Guaíba : Agropecuária, 2001. 166 p.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194. 2006.

HOITINK, H. A. J.; BOEHM, M. J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 427-446. 1999.

HORST, R. K.; NELSON, P. E. **Compendium of chrysanthemum diseases**. St. Paul : APS Press, 1997. 62 p.

HOWEL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10. 2003.

HOWEL, C. R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 178-180. 2006.

IBRAFLOR. Informativo IBRAFLOR, Holambra, SP, 2002.

IMENES, S. de L.; ALEXANDRE, M. A. V. **Boletim Técnico: aspectos fitossanitários do Crisântemo**. n. 5. São Paulo : Instituto Biológico, 1995. p. 5-47 (bimestral).

LARANJEIRA, D. Situação atual do controle biológico de *Fusarium* spp. In: VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: UFSM e EMBRAPA Uva e Vinho, 27 e 28 de novembro de 2001.

LARKIN, R. P.; FRAVEL, D. R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of fusarium wilt of tomato. **Plant Disease**, v. 82, n. 9, p. 1022-1028. 1998.

LEONI, C.; GHINI, R. Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p.67-75. 2003.

LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 70, p. 404-412. 1980.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, v. 55, p. 1-7. 1998.

MELO, I. S. Potencialidades da utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. Cap. 9. In: Bettiol, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente, 1991, 388 p.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295. 1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. Cap. 1. In: MELO, I. S. de., AZEVEDO, J.L.de. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MENEZES, J. P. ***Trichoderma* spp. como bioprotetor de crisântemo e reação de cultivares de crisântemo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi***. 2003. 76f. Dissertação (Mestrado em agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A. M.; ANDRADE, D. E. G. T. Manejo integrado de doenças radiculares. Cap. 15. In: **Ecologia e Manejo de patógenos em Solos Tropicais**. MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. Recife : UFRPE, 2005. 398 p.

OKUYAMA, M. H.; SAITO, I. Crisântemo. In: CASTRO, C. E. F. (Coord.) Simpósio Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 1992, Maringá. **Manual de Floricultura...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1992. 279p.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. da. Compatibilidade vegetativa de Nit-mutantes de *Fusarium solani* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro e à soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 89-92. 2003.

POLETTI, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; SANTIN, D.; WEBER, M. N. D.; BLUME, E. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil.) na região do Vale do Taquarí – RS. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.

RAMIREZ, I. S. et al. ***Trichoderma harzianum* (Cepa A34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento**. Habana : INISAV, 1995. 36 p.

REIS, A.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 21, n. 1, p. 16-20. 1995.

RUPE, J. C. et al. Vertical and temporal distribution of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* in fields with sudden death syndrome of soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 245-251. 1999.

SALGADO, C. L.; AMORIM, L. Sintomatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.212-223, 1995.

SAREMI, H.; BURGESS, L. W.; BACKHOUSE, D. Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 31, p. 941-47, 1999.

SCHMIDT, C. M. **Utilização do Ácido Giberélico no Manejo de cultivo de crisântemo de corte “Viking”**. 2001. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

SILVA-RIBEIRO. R. T. Espécies de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos: visão acadêmica e empresarial. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Anais...** Brasília : SBF, 01 a 05 de agosto de 2005. p. S31.

SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 198-203. 1989.

TEDESCO, M.J., GIANELLO, C., BISSANI, C., BOHEN, H. & VOLKSWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre : Departamento de Solos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. Boletim Técnico, 5.

TSAHOURIDOU, P. C.; THANASSOULOPOULOS, C. C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 767-776. 2002.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I – história, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 271-297. 1999.

ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A.; CAPUCHO, A. S. Resistência a doenças de plantas induzida pela nutrição mineral. Cap. 9. In: **Ecologia e Manejo de patógenos em Solos Tropicais**. MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. Recife : UFRPE, 2005. 398 p.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. D.; SILVEIRA JUNIOR, P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores: SANEST**. Pelotas: UFPEL, 1984. (Registro SEI nº 06606-0 categoria AO).

CAPÍTULO II

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* COM BIOPREPARADOS DE *Trichoderma* sp. E SOBREVIVÊNCIA DE *Trichoderma* sp. EM SUBSTRATO COMERCIAL

RESUMO

O crisântemo é uma das flores mais comercializadas em todo o Brasil. Seu cultivo em ambiente protegido tem crescido no Rio Grande do Sul. Porém um dos principais problemas que têm limitado sua produção são os danos causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* Link, agente causal de murcha vascular. O controle dessa doença é bastante difícil, pois esses patógenos desenvolvem-se no solo e penetram no hospedeiro via sistema radicular, tornando o controle químico ineficiente. Assim, o controle biológico é uma alternativa viável, uma vez que vários microrganismos, inclusive *Trichoderma* sp. Persson, destacam-se como excelentes antagonistas, pois inibem vários fitopatógenos através de competição, parasitismo direto e produção de metabólitos secundários, como enzimas líticas e antibióticos. Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da incorporação, em substrato comercial, de biopreparados de *Trichoderma* spp, visando o controle de *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, bem como, seus efeitos no crescimento vegetal e sua sobrevivência nesse substrato. Três isolados de *Trichoderma* sp. foram selecionados *in vitro* pelo teste de Confronto Direto para produção de biopreparados. Após a inoculação do patógeno, os bioprodutos (UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 e o produto comercial Agrotrich®) foram, individualmente, incorporados ao substrato. As avaliações foram realizadas após 100 dias, onde se observou a incidência e severidade da murcha, bem como, altura de muda, número de folhas e inflorescências e massa seca de raiz. Para avaliação da sobrevivência de *Trichoderma* sp., realizou-se a quantificação do número de UFC/g de solo desse fungo. O biopreparado do isolado UFSMT15.1 de *Trichoderma* sp. foi eficiente no biocontrole da murcha vascular, perfazendo 100% de controle. Nos tratamentos com

Agrotrich, UFSMT16 e UFSMT17, a severidade da doença foi alta, com notas variando de 7 a 8,5. O isolado UFSMT15.1 apresentou maiores médias em relação à altura de muda. Houve aumento na concentração de UFC/g de solo de *Trichoderma* sp. após a incorporação dos biopreparados.

Palavras-chaves: Biocontrole, biopreparado, murcha vascular e Calabria.

2.1- INTRODUÇÃO

O crisântemo é um produto de ampla comercialização em todo o Brasil e tipicamente para consumo interno. Mesmo sendo uma flor geralmente de produção em larga escala, muitos produtores agregam a melhor administração da mão-de-obra, a comercialização direta, o menor custo de transporte e o atendimento personalizado ao varejista, tornando seu cultivo rentável em baixa escala (GRUSZYNSKI, 2001).

Com boas perspectivas de aumento de produção, o cultivo de crisântemo em ambiente protegido tem crescido de forma significativa na região central do Rio Grande do Sul. Entretanto, um dos principais problemas que têm limitado sua produção são os danos causados por fungos do gênero *Fusarium*, em especial, *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*.

Fusarium Link é um dos gêneros de fungos mais importantes que existem, com várias espécies capazes de causar doenças em plantas, sendo comuns as podridões de raízes, caules e frutos, além das murchas vasculares (NELSON et al., 1983). No cultivo de crisântemo, várias espécies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, e outros) destacam-se como agentes causais de murcha vascular (HORST & NELSON, 1997). Algumas espécies são particularmente comuns no solo, onde podem persistir sob a forma de clamidósporos ou como hifas, enquanto que outras espécies produzem conídios disseminados pelo ar, colonizando normalmente ramos, folhas, inflorescências e frutos (VENTURA, 1999).

Na floricultura, as doenças de plantas causadas por patógenos de solo são responsáveis por perdas severas em várias culturas. Após serem introduzidos numa área, esses fitopatógenos dificilmente são erradicados mesmo sendo empregados métodos de controle diversificados. A utilização de cultivares resistentes, sob o ponto de vista fitossanitário, é a primeira recomendação para o controle dessas doenças, entretanto, dispõe-se de poucas variedades resistentes, principalmente no caso do crisântemo (IMENES & ALEXANDRE, 1995).

O controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, considerado como a única medida eficiente e economicamente viável. Porém, esse controle é bastante difícil, pois esses patógenos desenvolvem-se no solo e penetram no hospedeiro via sistema radicular, tornando o controle químico ineficiente (LARANJEIRA, 2001). Além disso, o uso indiscriminado de produtos químicos tem induzido resistência em fitopatógenos, intoxicação em pessoas e animais, além de contaminação ambiental. Sabe-se ainda que para que os agroquímicos atinjam o alvo, isto é, o fitopatógeno, estes devem ultrapassar barreiras físicas, químicas e biológicas presentes no solo (FRANCESCHINI, 2001; FRIGHETTO, 2000).

O manejo de doenças causadas por patógenos de solo é um contínuo desafio para os produtores e pesquisadores. Diversos microrganismos vêm sendo testados no controle biológico de várias doenças de plantas. Entre os biocontroladores usados contra patógenos do solo tem-se destacado *Trichoderma* sp., uma vez que esse fungo inibe vários patógenos através de competição, parasitismo direto e produção de metabólitos secundários, como enzimas líticas e antibióticos (MELO, 1998).

Trichoderma Persson é um deuteromiceto que produz abundantes conídios em conidióforos que emergem diretamente das hifas. É um fungo de solos orgânicos, vivendo saprofiticamente ou parasitando outros fungos e um antagonista eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos. Várias espécies têm sido utilizadas em biocontrole tanto de patógenos radiculares, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Armillaria* spp., quanto da parte aérea, como *Venturia* spp. e *Botrytis* spp. (MELO, 1996).

De acordo com Howel (2003), espécies de *Trichoderma* são capazes de suprimir o desenvolvimento de vários fungos fitopatogênicos, e seus mecanismos antagonistas são fortemente influenciados pelo tipo de solo, condições de temperatura, umidade e microflora associada. Locke (1985) observaram que um

isolado selvagem de *Trichoderma viride* e um biótipo resistente a Benomyl, sozinhos ou em combinação com *Aspergillus ochraceus* reduziram em pelo menos 50% a murcha por *Fusarium* em crisântemo.

O fungo *T. virens* aplicado na forma granular em sementes de algodão colonizou as raízes, reduzindo a colonização destas por *Fusarium* spp. e promoveu a supressão da murcha em algodão causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (HOWELL et al., 1997). Segundo Sivan & Chet (1989), a adição de conídios de *Trichoderma harzianum* (T-35) no solo ou em sementes reduziu significativamente a taxa de germinação de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *F. oxysporum* f. sp. *melonis* em algodoeiro e meloeiro, respectivamente.

Sabe-se que fungos do gênero *Trichoderma* têm-se destacado como agentes promotores de crescimento em plantas, germinação de sementes e produção de flores. Respostas à aplicação de *Trichoderma* spp. são caracterizadas por aumentos significativos na percentagem de germinação, no peso seco e na altura de plantas (MELO, 1996).

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da incorporação, em substrato comercial, de bioprotetores de *Trichoderma* spp., visando o controle da murcha por *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo, bem como, sua sobrevivência nesse substrato.

2.2- MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e Câmara de Crescimento do Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

2.2.1- Seleção dos isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*

Na seleção de antagonistas a *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* foram utilizados 100 isolados de *Trichoderma* sp. obtidos a partir da coleta de 30 amostras de solo realizada em estufa com produção comercial de crisântemo (Capítulo I).

Em quatro repetições, realizou-se o teste de Confrontação Direta, no qual um disco de meio de cultura Nash-Snyder (NS) (Anexo 3) de 12mm de diâmetro, contendo micélio do fitopatógeno foi transferido para placas de Petri (de 9,0 cm) a 0,5cm da borda, contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Anexo 1). O material foi incubado durante 48 horas a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, um disco de 12mm de diâmetro contendo BDA e estruturas dos isolados de *Trichoderma* sp. foi transferido para as placas em posição oposta ao disco de micélio do patógeno. As placas foram mantidas a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas.

Após oito dias, realizou-se a avaliação das placas, baseada no critério de Bell et al. (1982), no qual se utiliza uma escala de notas variando de 1 a 5, onde:

- 1- Antagonista cresce e ocupa toda placa;
- 2- Antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno (2/3 da placa);
- 3- Antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa, (nenhum organismo domina o outro);
- 4- Patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista (2/3 da placa);
- 5- O patógeno cresce e ocupa toda placa.

2.2.2- Produção dos biopreparados de *Trichoderma* sp.

Os biopreparados foram produzidos a partir dos três isolados de *Trichoderma* sp. (UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17) selecionados no teste de Confronto Direto.

Os isolados de *Trichoderma* sp. foram multiplicados, separadamente, em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) por sete dias a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas em incubadora BOD.

Na fabricação de cada um dos biopreparados, 50 g de grãos de arroz e 25 mL de água destilada foram colocados em erlenmeyers de 250 mL e esterilizados por três vezes consecutivas em autoclave a 120°C (1 atm) por 40 min. Posteriormente, quatro discos de BDA de 12 mm de diâmetro contendo micélio e/ou esporos (incubados por uma semana) do isolado de *Trichoderma* spp. foram incorporados ao substrato.

De acordo com Cejas et al. (2000), o método mais comum na produção de biopreparados de *Trichoderma* utiliza substrato sólido, utilizando-se como meios de cultura: cevada, arroz, trigo, entre outros. Com o substrato sólido se obtém grandes quantidades de conídios que são mais estáveis ao longo do tempo.

Após 20 dias, o substrato foi retirado do erlenmeyer e colocado em envelopes de papel-toalha e levados ao forno por aproximadamente 72 horas a 30°C (\pm 5°C). Após a secagem, o substrato foi triturado em liquidificador até obter-se um material fino e homogêneo.

2.2.3- Obtenção e produção do inóculo do patógeno

O fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* foi isolado de plantas de crisântemo (cv. Calabria) cultivado em estufa comercial no município de Itaara (RS) (Capítulo I), as quais apresentavam os sintomas típicos da doença descritos por Horst & Nelson (1997).

Segundo metodologia utilizada por Sandoval et al. (1998) e Sandoval & López (2000), hastes das plantas infectadas foram coletadas com auxílio de tesoura e pinça. Depois de coletadas, partes da planta infectada foram acondicionadas em sacos de papel e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia. Realizou-se uma assepsia externa das partes da planta através da imersão em álcool (70%), hipoclorito de sódio NaClO (0,5%) e três imersões em água destilada esterilizada por 30 segundos cada. As partes foram secas em papel filtro esterilizado e colocadas em meio de cultura NS. Além disso, as estruturas do patógeno (micélio cotonoso) foram retiradas das plantas e colocadas em placas de Petri, contendo meio de cultura NS. Após sete dias de incubação a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas, foi realizada a repicagem do fitopatógeno, até obter-se cultura axênica do mesmo.

O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* foi identificado pelo método da Folha-de-Cravo-Ágar (FCA ou CLA) (Anexo 4). Segundo Ventura (1999), espécies de *Fusarium* esporulam no meio FCA em seis a dez dias, apresentando conídios com formas uniformes e nítidas, o que não acontece no meio de cultura BDA. Os macroconídios são formados em esporodóquios que usualmente se desenvolvem sobre os pedaços de folhas de cravo, o que é importante na identificação das espécies, enquanto que os microconídios formam-se nas hifas sobre o ágar. O modo de formação dos microconídios, a presença de cadeias e a formação de clamidósporos podem ser observados diretamente em microscópio óptico.

Para o preparo do inóculo do patógeno, 50 g de grãos de arroz foram colocados em erlenmeyers de 250 mL e acrescentados 25 mL de água destilada. Esse material foi esterilizado por três vezes consecutivas em autoclave a 120°C (1 atm) por 40 min. Posteriormente, discos de meio NS de 12 mm de diâmetro contendo micélio e/ou esporos (incubados por uma semana) do patógeno foram incorporados ao arroz. Após um período de incubação de aproximadamente 20 dias, o substrato foi totalmente colonizado pelo patógeno.

2.2.4- Incorporação do patógeno no substrato

A partir da fabricação dos biopreparados de *Trichoderma* e do inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, o experimento foi efetivamente instalado em câmara de crescimento. Foram utilizadas bandejas plásticas (50 x 50 x 25 cm) com aproximadamente 5 L de substrato comercial Plantimax HA® em cada uma delas.

As bandejas foram colocadas em câmara de crescimento para manutenção de temperatura 28°C (± 2) e umidade (70-80%) ideais.

Na inoculação do patógeno, utilizaram-se seis gramas por metro quadrado (g/m^2) de arroz colonizado pelo patógeno (STEFANELO, 2004).

2.2.5- Incorporação dos biopreparados no substrato

Sete dias após a inoculação do patógeno, os biopreparados foram incorporados manualmente ao substrato. Utilizando-se 2 g/m² de bioproduto, segundo recomendação do produto comercial Agrot rich[®].

Os tratamentos consistiram dos biopreparados UFSMT15.1, UFSMT16, UFSMT17 e Agrot rich[®] e um tratamento-controle, com a incorporação do patógeno (controle +). Utilizou-se ainda um controle negativo, sem a incorporação do patógeno (controle -) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Tratamentos utilizados no teste de biocontrole da murcha por *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo (cv. Calabria). Santa Maria, RS, 2006.

Tratamentos	
CT+	Controle positivo (substrato com patógeno)
Agrot	Agrot rich [®]
T15.1	UFSMT15.1
T16	UFSMT16
T17	UFSMT17
CT-	Controle negativo (somente substrato)

2.2.6- Transplante das mudas de crisântemo (cv. Calabria)

As mudas de crisântemo cv. Calabria (já enraizadas) foram transplantadas no substrato (15 mudas por bandeja), logo após a incorporação dos biopreparados no substrato. Utilizou-se a cv. Calabria devido à sua alta suscetibilidade ao patógeno e preferência para produção (MENEZES, 2003). As mudas foram irrigadas e observadas diariamente.

2.2.7- Avaliação de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Fusarium*

Cem dias após o transplante das mudas, avaliaram-se incidência e severidade da murcha por *Fusarium*, bem como, altura de muda, número de folhas e inflorescências e massa seca de raiz.

A avaliação da severidade da murcha foi realizada baseando-se em escala de notas variando de 1 a 9, relacionada com a presença de sintomas visíveis na parte aérea, como o aparecimento de folhas com aspecto queimado, de cor marrom, na base das plantas; folhas torcidas, cloróticas e/ou murchas; e planta morta (FREITAS, 2003). De acordo com a percentagem de sintomas visíveis da parte aérea, utilizou-se a escala abaixo:

1= ausência de sintomas;

3 = menos que 10% da planta com sintoma;

5 = entre 10 e 50% da planta com sintoma;

7 = mais de 50% da planta com sintoma;

9 = planta morta.

2.2.8- Sobrevivência de *Trichoderma* sp. no substrato comercial e nas raízes

Para a avaliação da sobrevivência de *Trichoderma*, foram coletadas quatro amostras de substrato de cada tratamento para determinação do número de unidades formadoras de colônias de desse fungo. Dez gramas de substrato de cada tratamento foram suspensos, separadamente, em 90 mL de água destilada esterilizada e agitados por 10 minutos em agitador (Fisher FlexaMix – USA). Em oito repetições, 1 mL da diluição 10^{-3} foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após incubação por quatro dias a 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas, os fungos presentes nas placas foram quantificados e identificados, em nível de gênero, através de microscópio estereoscópico e ótico, com base em bibliografia especializada (BARNETT & HUNTER, 1999).

O número de unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo) foi obtido

através da média do número de colônias encontradas nas placas. De acordo com Carter (1993), utilizaram-se as equações $FD = D_i \times D_s \times Q$ (FD = Fator de diluição, D_i = diluição inicial, D_s = diluições subseqüentes, e Q = volume de solução plaqueado) e $UFC = 1 / FD \times n$ (UFC = número de unidades formadoras de colônias, FD = Fator de diluição, n = número de colônias encontradas na placa).

Além disso, de três mudas de cada tratamento, foram retiradas, aleatoriamente, duas raízes, as quais foram lavadas com água destilada esterilizada, com auxílio de uma peneira de 2 mm, e utilizadas para avaliação da presença de *Trichoderma* sp. Um mililitro da água de lavagem das raízes foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultura BDA em oito repetições e incubado como citado anteriormente. As raízes, por sua vez, foram cortadas com auxílio de uma tesoura esterilizada e, entre cada raiz, a tesoura foi lavada em hipoclorito 75% e água destilada.

Para o plaqueamento direto das raízes, retiraram-se duas raízes, aleatoriamente, de mais quatro plantas, as quais foram lavadas em destilada esterilizada, com auxílio de uma peneira de 2 mm. Estas raízes foram secas em papel filtro esterilizado e plaqueadas em meio de cultura BDA. Após incubação por quatro dias a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas, os fungos presentes nas placas foram quantificados e identificados segundo metodologia citada acima.

2.2.9- Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições. No experimento de controle biológico, os dados referentes ao teste de Confronto Direto, altura de muda, número de folhas e inflorescências e massa seca de raiz foram submetidos à análise da variância. Para comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a 1% de probabilidade através do programa estatístico SANEST (ZONTA et al., 1984). No teste de sobrevivência de *Trichoderma*, os dados referentes ao número de unidades formadoras de colônias (UFC) também foram submetidos à análise da variância com transformação Raiz ($X + 100$). Para comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa estatístico SANEST (ZONTA et al., 1984).

2.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1- Seleção de isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*

Dos 100 isolados de *Trichoderma* spp., três foram selecionados no teste de Confronto Direto. Os isolados UFSMT15.1 e UFSMT16 destacaram-se com média de notas 1,25. Já o isolado UFSMT17 apresentou nota média de 2,5, destacando-se como um dos piores isolados neste teste. Como nem sempre o comportamento *in vitro* representa o que ocorre *in vivo*, recomenda-se utilizar, nos testes *in vivo*, isolados com alto e baixo desempenhos no teste de Confronto Direto. Além disso, os isolados UFSMT15.1 e UFSMT17 são provenientes de amostras de solo coletadas em pontos sem a presença de sintomas de murcha nas plantas. Já o isolado UFSMT16, foi obtido a partir de amostra de solo com presença de sintomas da doença no crisântemo (Capítulo I).

A análise da variância indicou diferença significativa entre os isolados de *Trichoderma* sp. utilizados no confronto com o patógeno (Tabela 2.2).

Tabela 2.2- Teste de confronto direto entre *F. oxysporum* e isolados de *Trichoderma* sp. Santa Maria, RS, 2006.

Isolado de <i>Trichoderma</i> sp.	Escala de 1 a 5 (BELL et al., 1982)
UFSMT17	2,50 a *
Isolados UFSMT 1B, 2, 2A, 2C, 3, 3A, 4, 5, 5B, 5.1, 5.1A, 5.1B, 5.1C, 6, 6A, 6B, 6C, 6D, 7, 7A, 7B, 7.1D, 8, 8A, 8B, 9B, 9C, 10, 10A, 10B, 10C, 11, 11A, 13, 13A, 13B, 15, 15A, 15B, 15.1A, 15.1B, 16A, 16B, 17A, 17B, 17C, 17D, 18, 18A, 19A, 19B, 20, 20A, 20B, 21, 22, 22A, 22B, 22C, 23, 23B, 32D	2,25 ab
Isolados UFSMT 1, 1A, 2B, 4A, 4B, 4C, 5A, 7.1, 7.1A, 7.1B, 7.1C, 8.1A, 8.1B, 9, 9A, 12, 12A, 12B, 12C, 14, 14A, 14B, 16C, 16D, 16.1, 16.1 A, 18B, 19, 21A, 21B, 21C, 23A, 23C, 24, 24A, 24B	2,00 ab
UFSMT15.1	1,25 b
UFSMT16	1,25 b

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey (CV = 15,19%).

Isolados de *Trichoderma* spp. são muito utilizados em testes de Confronto Direto, obtendo-se resultados positivos sobre os mais variados fitopatógenos. De acordo com Melo (1998), no ponto de encontro entre os dois micélios possivelmente ocorre antibiose e parasitismo, uma vez que *Trichoderma* spp. pode detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção.

Segundo Howell (2003), espécies de *Trichoderma* são hábeis na supressão do crescimento de vários fungos em meios de cultura contendo ágar e em condições de temperatura menores que 40° C, como observado no tratamento de segmentos de raízes de feijoeiro infectadas por *Macrophomina phaseolina* com *T. virens*. Quando estes segmentos foram plaqueados em meio com ágar, apenas *T. virens* cresceu a partir das raízes. Além disso, segundo Cardoso (1990) e Melo (1996), os organismos competem entre si para obter um recurso indispensável, como

nutrientes, água, luz, espaço, fatores de crescimento, oxigênio, entre outros. Para Ghisaverti & Sivasithaparam (1991), o potencial hiperparasítico das espécies de *Trichoderma* está relacionado com a competição por espaço e com atividades metabólicas que lhes permitem serem eficientes no hiperparasitismo das estruturas de outros fungos.

Assim, possivelmente, diferenças no desempenho de isolados do mesmo fungo estejam relacionadas a esses diferentes mecanismos de antagonismo.

2.3.2- Efeito de *Trichoderma* spp no biocontrole de *Fusarium*

Em relação à incidência da murcha por *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, os tratamentos que apresentaram maiores valores foram: substrato com patógeno (CT), UFSMT16 (T16), Agrotrich (Agrot) e UFSMT17 (T17), respectivamente. Contudo, no tratamento com o isolado UFSMT15.1 (T15.1) não se observou incidência da doença, perfazendo, portanto, 100% de biocontrole (Figura 2.1). No controle negativo, não ocorreu a doença.

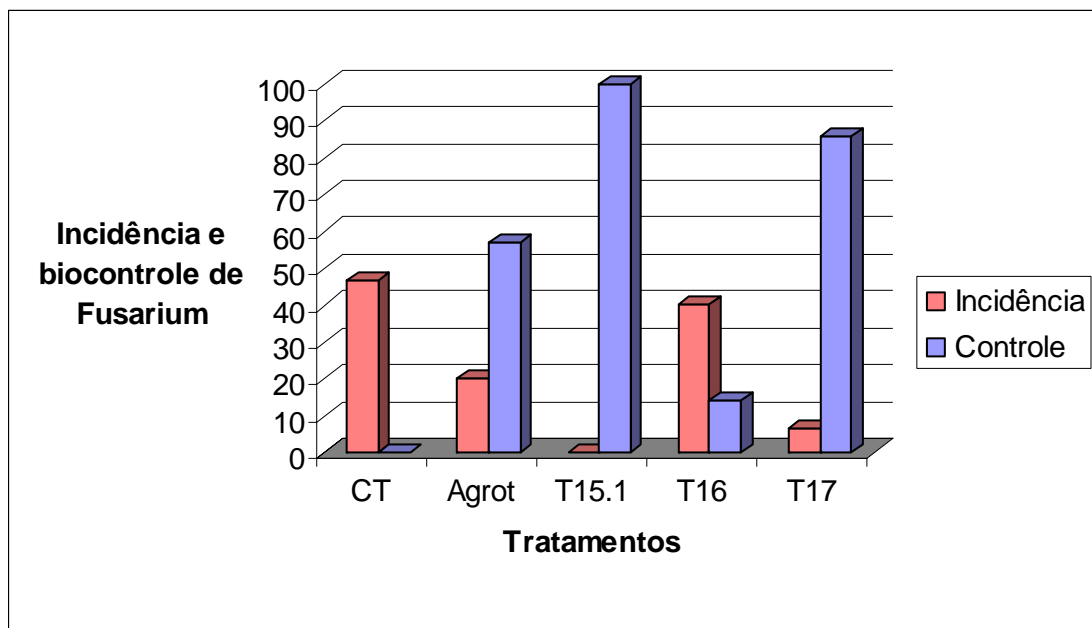


Figura 2.1- Incidência e biocontrole da murcha causada por *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo cv. Calabria por diferentes biopreparados.

Santa Maria, RS, 2006.

A severidade da doença foi avaliada segundo escala de notas de 1 a 9 e, neste experimento, nos tratamentos com incidência da doença as notas variaram de 7 a 8,5. Ou seja, observou-se desde folhas com aspecto queimado, de cor marrom, na base das plantas; folhas torcidas, cloróticas e/ou murchas e sintomas em mais de 50 a 100% da planta (Figura 2.2).

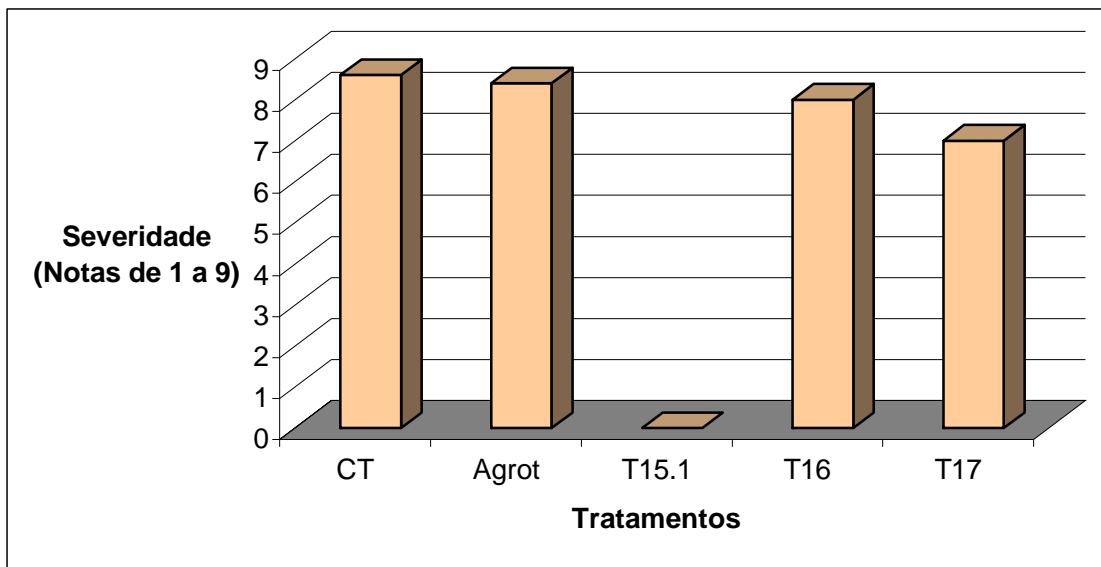


Figura 2.2- Severidade da murcha, causada por *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, em crisântemo cv. Calábria em diferentes tratamentos com biopreparados a base de *Trichoderma* sp. Santa Maria, RS, 2006.

De acordo com os dados obtidos, pode-se considerar o tratamento com o isolado UFSMT15.1 de *Trichoderma* sp. como eficiente no biocontrole do patógeno, uma vez que neste tratamento houve 100% de controle da doença.

Além disso, a análise estatística dos dados mostrou que apenas para a variável altura de muda houve diferença significativa entre as médias, onde novamente o tratamento UFSMT15.1 destacou-se com maior média (37,33 cm), seguido do controle negativo, Agrotich e UFSMT17 (Tabela 2.3). Em relação às variáveis: número de folhas e de inflorescências, apesar de não haver diferença significativa, UFSMT15.1 destacou-se mais uma vez com os valores 66,13 e 6,2,

respectivamente. Em contrapartida, o controle negativo destacou-se com maior média para a variável massa seca de raiz (Tabela 2.3).

Tabela 2.3- Altura, número de folhas e inflorescências e massa seca de raiz de plantas de crisântemo (cv. Calabria) tratadas com biopreparados de *Trichoderma* sp. Santa Maria, RS, 2006.

Tratamentos	Altura (cm)	Nº de folhas	Nº inflorescências	Massa seca de raiz (g)
Controle +	26,40 ab*	50,93 a	5,53 a	3,06 a
Agrotrich	32,13 ab	59,73 a	4,93 a	2,53 a
UFSMT15.1	37,33 a	66,13 a	6,20 a	2,13 a
UFSMT16	20,26 b	34,53 a	3,66 a	2,20 a
UFSMT17	32,00 ab	58,93 a	5,73 a	1,86 a
Controle -	36,13 a	65,33 a	5,93 a	2,51 a
C.V.	25,87	26,67	27,08	24,52

* Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

As variações encontradas entre os biopreparados de *Trichoderma* sp. utilizados, sugerem a existência de diferentes potenciais antagonistas entre os isolados de *Trichoderma* sp. testados ou, ainda, fatores ambientais que podem afetar a distribuição do antagonista no substrato, interferindo na sobrevivência e na proliferação desses micoparasitas no substrato e na rizosfera.

De acordo com Melo (1996), as associações parasíticas são afetadas tanto por fatores intrínsecos como por ambientais. Os fatores intrínsecos incluem: características genéticas e variabilidade do parasita e do hospedeiro, natureza química das paredes de células, presença ou ausência de fatores de crescimento, entre outros. Os fatores ambientais, tais como nutrição, pH, temperatura, umidade, disponibilidade de água e textura do solo ou substrato, têm-se mostrado capazes de afetar o parasitismo e, portanto, afetar o desempenho dos agentes de biocontrole. Entretanto, neste experimento, a influência de fatores ambientais foi mínima, já que as mudas foram mantidas em câmara de crescimento.

De acordo com os dados obtidos, sugere-se a existência de diferenças no potencial de biocontrole e promoção e/ou interferência no crescimento vegetal desses isolados, uma vez que, de acordo com Ousley et al. (1993), uma das principais diferenças entre os isolados de *Trichoderma* sp. quanto à interferência no crescimento de plantas está na produção de metabólitos secundários. E, segundo os autores, isolados de *Trichoderma* produtores de ácidos graxos e glicerol promoveram o crescimento de trigo, porém um isolado produtor de viridiol interferiu negativamente na germinação de alface.

Segundo Kleifeld & Chet (1992), os vários mecanismos que fazem com que ocorra a interferência positiva ou negativa dos fungos do gênero *Trichoderma* no crescimento de plantas precisam ser estudados para que possam ser utilizados adequadamente.

2.3.3- Sobrevivência de *Trichoderma* sp. no substrato comercial e nas raízes

Em relação à sobrevivência de *Trichoderma* sp. no substrato, na água de lavagem de raízes e nas raízes, a análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2.4). No substrato, os tratamentos com Agrotich[®] e UFSMT16 destacaram-se com maior média, seguidos dos tratamentos UFSMT17 e UFSMT15.1.

Na água de lavagem de raízes, os tratamentos com Agrotich[®] e UFSMT15.1 apresentaram maiores médias de UFC de *Trichoderma*. Já, nas raízes, os tratamentos com UFSMT15.1, UFSMT17 e UFSMT16 destacaram-se com maior número de UFC, respectivamente.

Tabela 2.4- Número de unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo) de *Trichoderma* sp. encontradas nos seis tratamentos. Santa Maria, RS, 2006.

Tratamentos	Nº de UFC (x 10 ²) de <i>Trichoderma</i>		
	Substrato	Água de lavagem	Raízes
Controle +	0,99 b*	0,98 b	0,61 c
Agrotrich	2,61 a	2,24 a	0,98 bc
UFSMT15.1	2,37 a	2,23 a	2,61 a
UFSMT16	2,61 a	1,61 ab	1,74 abc
UFSMT17	2,48 a	1,86 ab	1,98 ab
Controle -	2,10 ab	1,49 ab	0,74 c
C.V.	3,47	3,32	3,35

* Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

De forma geral, a maior concentração de UFC/g foi encontrada nas amostras de substrato e raízes. Nas amostras de substrato e solução de raízes, Agrotrich destacou-se com as maiores médias. No plaqueamento de raízes, UFSMT15.1 destacou-se com melhor média, seguido de UFSMT17 e UFSMT16. Tal fato sugere a existência de diferenças na atividade dos isolados testados.

No teste de Confronto Direto (*in vitro*), os isolados UFSMT15.1 e UFSMT16 destacaram-se no biocontrole do patógeno, enquanto que o isolado UFSMT17 não foi um antagonista eficiente. Em contrapartida, no teste *in vivo*, o isolado UFSMT15.1 manteve seu desempenho, seguido dos isolados UFSMT17 e UFSMT16, respectivamente.

É importante considerar que a maior concentração de unidades formadoras de colônias de *Trichoderma* sp. nas raízes de crisântemo cultivado em substrato tratado com o biopreparado do isolado UFSMT15.1 pode estar relacionado com o eficiente biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* por esse mesmo isolado. De acordo com Harman (2006), os efeitos diretos de *Trichoderma* spp em plantas são notáveis e tão significantes quanto os efeitos diretos deles em outros fungos. Espécies de *Trichoderma* podem ser indutores de resistência de plantas altamente eficientes. Uma recente revisão lista 11 relatórios que demonstram o

controle de uma gama extensiva de fitopatógenos por *Trichoderma* sp., inclusive oomicetos, bactérias e um vírus, através de indução de resistência sistêmica. Os fungos, especialmente rizosfera-competentes, colonizam as superfícies das raízes e penetram na epiderme e no córtex. Uma vez a hifa de *Trichoderma* dentro das raízes, são produzidos uma série de metabólitos do fungo que induzem mecanismos bioquímicos na planta, os quais restringem o crescimento de *Trichoderma* a uma área pequena. As moléculas dos metabólitos podem incluir várias proteínas diferentes, como proteínas avr, as quais são liberadas por ação de enzimas extracelulares, como ocorre na reação de micoparasitismo. Assim, ocorrem

f u n g o s

2.5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382. 1982.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Cap. 15. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 223-236.

CARDOSO, J. E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1990. 30 p. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 30).

CARTER, M. R. (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 631 p.

CEJAS, A.; LARREA, O. F.; DÍAZ, R.; NIEVES, C.; FUENTES, R. Conservación de preparados líquidos de *Trichoderma harzianum* cepa A34. **Fitossanidad**, v. 4, n. 3-4, p. 73-76. 2000.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul : APS. 1983.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A. P.; CAMASSOLA, M. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 23, p. 32-37. 2001.

FREITAS, T. M. Q. **Dano, dinâmica populacional e fontes de resistência genética a *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado no em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

FRIGHETTO, R. T. S. Influência do manejo de agrotóxicos no meio ambiente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25 (suplemento), p. 271-274. 2000.

GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1011-1020. 1991.

GRUSZYNSKI, C. **Produção comercial de crisântemos: vaso, corte e jardim**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 166 p.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, 2006.

HORST, R. K.; NELSON, P. E. **Compendium of chrysanthemum disease**. St. Paul: APS Press, 1997. 62 p.

HOWELL, C. R.; DE VAY, J. E.; GARBER, R. H.; BATSON, W. E. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed. **The Journal of Cotton Science**, v. 1, p. 15-20, 1997.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases – the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10. 2003.

IMENES, S. de L.; ALEXANDRE, M. A. V. **Aspectos fitossanitários do crisântemo**. São Paulo: Instituto Biológico, Boletim Técnico 5 (bimestral), p. 5-47. 1995.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect growth response. **Plant and Soil**, v. 144, p. 267-272. 1992.

LARANJEIRA, D. Situação atual do controle biológico de *Fusarium* spp. In: VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: UFSM e EMBRAPA Uva e Vinho, 27 e 28 de novembro de 2001.

LOCKE, J. C. Biological control of *Fusarium* wilt of greenhouse-grown chrysanthemum. **Plant Disease**, v. 69, n. 2, p. 167-169, 1985.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295. 1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. Cap. 1. In: MELO, I. S. de., AZEVEDO, J. L. de. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MENEZES, J. P. ***Trichoderma* spp. como bioprotetor de crisântemo e reação de cultivares de crisântemo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi***. 2003, 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species**. London: Pennsylvania State University Press. 1983.

OUSLEY, M. A.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 26, p. 277-285. 1993.

SANDOVAL, I.; LÓPEZ, M. O.; BONILLA, T.; TOMÁS, Y. Hongos de suelo atacan al clavel y antagonismo *in vitro* com *Trichoderma* spp. **Fitossanidad**, v. 2, n. 3-4, p. 41-44. 1998.

SANDOVAL, I.; LÓPEZ, M. O. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A34 hacia *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del frijol. **Fitossanidad**, v. 4, n. 3-4, p. 69-72. 2000.

SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 198-203, 1989.

STEFANELO, D. R. **Doses, ambiente e forma de infecção causada por *Fusarium solani* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo (*Dendhranthea grandiflora*) cv. Calabria e seu controle por *Trichoderma virens*.** 2004, 66f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I – história, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 271-297. 1999.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.D.; SILVEIRA JUNIOR,P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores: SANEST.** Pelotas: UFPEL, 1984. (Registro SEI nº 06606-0 categoria AO).

WINDHAM, M. T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.76, p. 518-521. 1986.

CAPÍTULO III

POPULAÇÃO DE *Trichoderma* sp. E *Fusarium* sp. EM SOLO CULTIVADO COM CRISÂNTEMO E SUBMETIDO À DESINFESTAÇÃO E ADIÇÃO DE *Trichoderma* spp.

RESUMO

Como meio para crescimento microbiano, o solo é um ambiente dinâmico e heterogêneo, onde as práticas agrícolas alteram as características físicas, químicas e biológicas determinantes das condições de solo, influenciando as diversas populações na comunidade microbiana. Essas modificações refletem-se na composição, atividade e biomassa da comunidade microbiana, uma vez que a permanência de uma população no ecossistema fica condicionada à sua habilidade de adaptação e de resposta a mudanças ambientais. Nesse contexto, e devido à carência de informações sobre a dinâmica populacional de microrganismos habitantes do solo no cultivo de crisântemo, este trabalho objetivou avaliar a dinâmica populacional, especialmente, de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* presentes em solo utilizado no cultivo de crisântemo e submetido à esterilização com brometo de metila e adição de biopreparado de *Trichoderma* spp. Foram realizadas três coletas de amostras de solo nos meses de maio, junho e julho de 2005, com intervalo de 30 dias entre as coletas. Em junho, o solo foi desinfestado com brometo de metila, e após cinco dias, realizou-se o povoamento do solo com *Trichoderma* sp. através da incorporação de um biopreparado comercial desse fungo em quatro doses (0, 2, 4 e 6g/m²). As amostras de solo foram submetidas a diluições seriadas para avaliação do número de UFC/g de solo de *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. e outros gêneros fúngicos. A desinfestação do solo com brometo de metila reduziu a população microbiana. A dose de 6g/m² de biopreparado promoveu maior crescimento de *Trichoderma* sp. e, na dose de 2g/m² de pó biológico, observou-se menor número de UFC de *Fusarium* sp.

Palavras-chave: bioprotetor, UFC, brometo de metila e patógeno de solo.

3.1- INTRODUÇÃO

Os microrganismos habitantes do solo vivem em um habitat extremamente peculiar com relação a outros habitats terrestres devido à sua natureza heterogênea, complexa e dinâmica. Essas características permitem que organismos com metabolismos díspares possam conviver lado a lado, interagindo em estado de equilíbrio dinâmico, muitas vezes com relações de dependência essenciais para sua sobrevivência, proporcionando, assim, condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

As relações entre organismos influenciam vários processos do solo como a mineralização da matéria orgânica e de xenobióticos (como os agroquímicos), controle de pragas e doenças, ciclagem de nutrientes, formação de húmus e equilíbrio biológico. Em contrapartida, a atividade humana pode causar modificações significativas nos fatores químicos e físicos do solo, seja pela adição ou remoção de elementos ou por práticas de cultivo que causarão impacto na comunidade biológica, favorecendo o crescimento explosivo, por exemplo, de patógenos de solo (MELO & AZEVEDO, 2000).

Os organismos que habitam o solo são responsáveis direta ou indiretamente por processos bioquímicos diversos que controlam as transformações dos elementos químicos e transferências de energia no sistema solo-planta-atmosfera, constituindo-se na base de sustentação e produtividade dos ecossistemas terrestres em equilíbrio (MARTIN & ENGLISH, 1997).

Sabe-se que, em condições naturais, a elevada taxa de mortalidade dos patógenos e a baixa incidência das doenças são resultantes do somatório de muitas formas de estresses biológicos dos propágulos, através do parasitismo, predação ou estímulo à germinação, seguidos de exaustão e lise ou, ainda, em função da diminuição das reservas internas do patógeno, resultante de vários estresses impostos por uma microbiota associada (HOMECHIN, 1991).

A microbiota natural do solo é de grande importância no desenvolvimento de culturas, principalmente em regiões de agricultura intensiva. Porém, em decorrência das doenças causadas por patógenos de solo, inúmeros métodos de controle tais como o químico (brometo de metila - CH_3Br) e o físico (solarização do solo) são utilizados e podem causar alterações quantitativas e qualitativas nessa microbiota

(VENÂNCIO et al., 2006). A desinfestação do solo, através de fumigantes (como o brometo de metila – CH₃Br) altera tanto a população de patógenos quanto à população de organismos benéficos, podendo resultar em um ambiente favorável à reinfestação. Além disso, outros fatores limitantes têm contribuído para a inviabilização desses métodos, tais como: alto custo, perigo para o aplicador, contaminação ambiental (afeta a camada de ozônio) e possibilidade de fitotoxidez (BETTIOL, 1991; PINTO, 2006).

Segundo Venâncio et al. (2006), no tratamento do solo com brometo de metila, constatou-se um baixo número de espécies fúngicas reinfestantes. Essa observação corrobora com os dados do trabalho de Millhouse & Munneck (1981), que descreveram a presença de poucas espécies de fungos e bactérias em solos fumigados quando comparados com os não tratados. Nesse trabalho, *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. predominaram na nova composição da microbiota.

Diante desse cenário, após a esterilização do solo, o povoamento deste com antagonistas, como *Trichoderma* sp. e outros microrganismos, pode ser uma

freqüentemente ocorrem por falta de conhecimento da ecologia e da fisiologia dos microrganismos utilizados para esse fim em ecossistemas naturais.

Segundo Odum (1988), a dinâmica populacional é um ramo da ecologia que trata da dinâmica das populações, ou seja, é o estudo das variações das populações dos seres vivos de determinada espécie, com relação ao tempo e/ou ao espaço. Vásquez et al. (2000) encontraram flutuação populacional das comunidades microbianas na rizosfera de plantas de milho devido à adição de agentes microbianos (*Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Trichoderma*). Harman (2000) observou que o isolado T-22 de *T. harzianum* colonizou a raiz de diferentes culturas e deslocou a microflora, mudando a composição da microbiota.

Pouco se sabe sobre a dinâmica populacional de antagonistas (como *Trichoderma* sp.) incorporados ao solo no cultivo de crisântemo. Segundo Smith et al. (1992), o efeito de agentes de biocontrole sobre outros organismos que não o patógeno alvo é pouco documentado e se faz necessário o conhecimento das conseqüências ecológicas dessa interação.

Sabe-se que *Fusarium* é um dos gêneros de fungos importantes, com várias espécies capazes de causar doenças em plantas, como *F. oxysporum*, agente causal de murcha vascular em crisântemo. Além disso, esse gênero fúngico é formado por várias espécies e *formae speciales*, com capacidade de adaptação e sobrevivência por longos períodos no solo (VENTURA, 1999). Porém, a dinâmica populacional de *Fusarium* é relatada somente para grandes culturas (FREITAS, 2003).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a dinâmica populacional de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* presentes em solo utilizado no cultivo de crisântemo, submetido à desinfestação com brometo de metila e povoado com biopreparado de *Trichoderma* spp.

3.2- MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados em uma estufa com produção comercial de crisântemo de propriedade de Carlos Maciel no município de Itaara (RS) e no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.2.1- Local das coletas

As amostras de solo foram coletadas em estufa com produção comercial de crisântemo localizada no município de Itaara, RS (Figura 3.1). A escolha desse local foi devido à alta incidência de murcha por *Fusarium* sp. Este trabalho foi realizado em uma estufa com área de 600 m² (30 m x 20 m), pé direito de 2,5 m, estrutura de madeira e coberta com filme de PVC transparente.

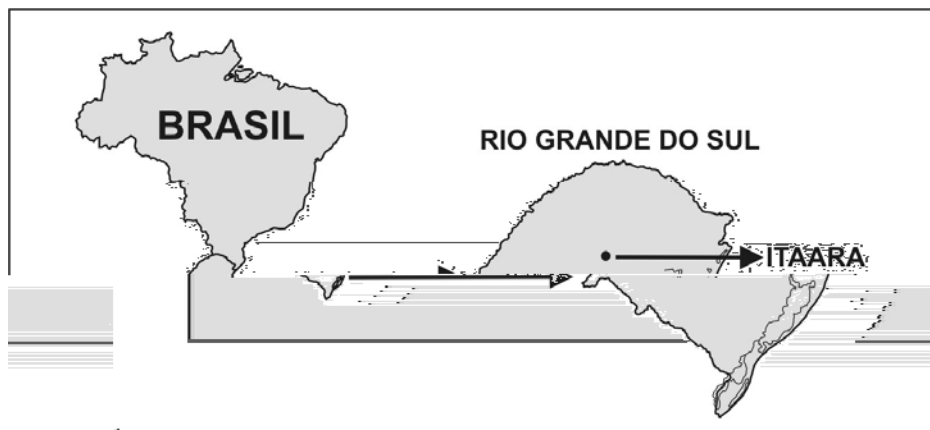


Figura 3.1- Localização do município de Itaara, onde se encontra a estufa utilizada neste experimento. Santa Maria, RS, 2005.

3.2.2- Coletas de amostras de solo

As coletas foram realizadas no lote nº 2 da estufa (Figura 3.2), uma vez que esse lote, ao longo do ano de 2004 e início de 2005, apresentou alta incidência de murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* durante os ciclos de produção de crisântemo.

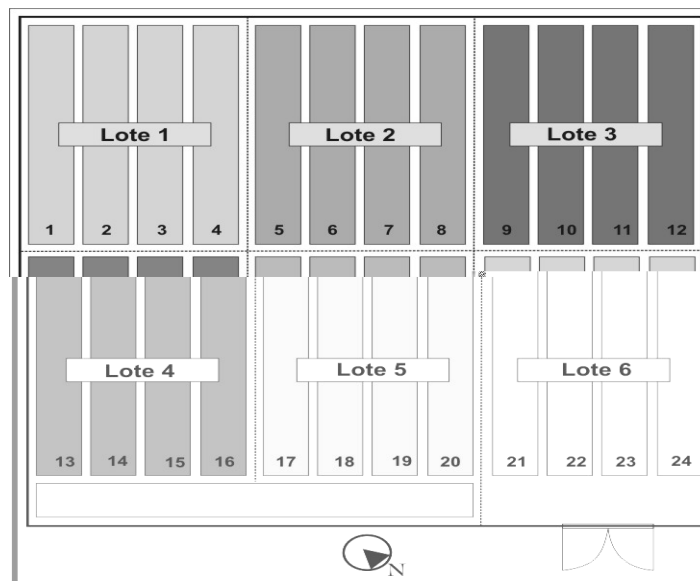


Figura 3.2- Croqui da estufa com indicação dos lotes. Santa Maria, RS, 2005.

Nesse lote, em cada um dos quatro canteiros, utilizou-se uma área experimental de 1,2 m², onde foram implantados os tratamentos.

Foram realizadas três coletas de amostras de solo nos meses de maio, junho e julho de 2005, com intervalo de 30 dias entre as coletas.

Na primeira coleta (maio/2005), os canteiros estavam sendo utilizados na produção de crisântemo. Em junho (2005), a segunda coleta foi realizada um dia após a retirada do plástico que cobria o lote durante a esterilização do mesmo com brometo de metila. A última coleta (julho/2005) foi realizada cinco dias após a incorporação do biopreparado de *Trichoderma* spp.

As amostras de solo foram coletadas com auxílio de uma pá de jardinagem (Tramontina - 9 x 14 cm) a uma profundidade de 0-10 cm, acondicionadas em sacos plásticos de 1L e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia. Entre cada um dos

pontos amostrados, a pá foi lavada em solução com hipoclorito 75% e água corrente.

3.2.3- Desinfestação do solo

Em decorrência da alta incidência de murcha por *Fusarium*, no dia 1º de junho de 2005, o lote nº 2 foi desinfestado com Brometo de Metila (Bromex®), utilizando-se dois frascos do produto por canteiro e cobrindo este por três dias com plástico.

3.2.4- Povoamento do solo com biopreparado à base de *Trichoderma* spp.

Cinco dias após a retirada do plástico dos canteiros, realizou-se a incorporação do biopreparado de *Trichoderma* spp. (Agrotrich®) no solo, mediante a aplicação de 0, 2, 4 e 6 g de pó por m² na área experimental do canteiro. O biopreparado foi incorporado na camada superficial do solo, segundo recomendações do bioproduto comercial acima citado.

3.2.5- Avaliação das amostras coletadas

Nos três períodos de amostragens, foram coletadas quatro amostras de solo para cada tratamento, compostas de aproximadamente 200 g.

As amostras de solo foram submetidas a diluições seriadas para a avaliação da presença de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Fusarium* e outros. Dez gramas de solo de cada amostra foram suspensos, separadamente, em 90 mL de água destilada esterilizada e agitados por 10 minutos em agitador (Fisher FlexaMix – USA). Em oito repetições, 1 mL da diluição 10⁻³ foi transferido para placas de Petri contendo os meios de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), seletivo para *Trichoderma* e Nash-Snyder (NS) (Anexos 1, 2 e 3). Após incubação por quatro dias a 25°C (± 2°C) e fotoperíodo de 12 horas, os fungos presentes nas placas foram quantificados e identificados, em nível de gênero, através de microscópio estereoscópico e ótico, com base em bibliografia especializada (BARNETT &

HUNTER, 1999).

O número de unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo) foi obtido através da média do número de colônias encontradas nas placas. Utilizando-se as equações $FD = D_i \times D_s \times Q$ (FD = Fator de diluição, D_i = diluição inicial, D_s = diluições subseqüentes, Q = volume de solução plaqueado) e $UFC = 1 / FD \times n$ (UFC = número de unidades formadoras de colônias, FD = Fator de diluição, e n = número de colônias encontradas na placa) (CARTER, 1993).

3.2.6- Análise de solo

3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da microbiota encontrada no solo da estufa (lote nº 2) antes e depois da desinfestação com brometo de metila, observou-se nítida redução na composição e concentração de fungos desse solo (Figura 3.3). Segundo Bernardes & Santos (2006), modificações nos agroecossistemas decorrentes de práticas agrícolas, refletem-se na composição, atividade e biomassa da comunidade microbiana, e a permanência de uma população no ecossistema fica condicionada à sua habilidade de adaptação e resposta a mudanças ambientais.

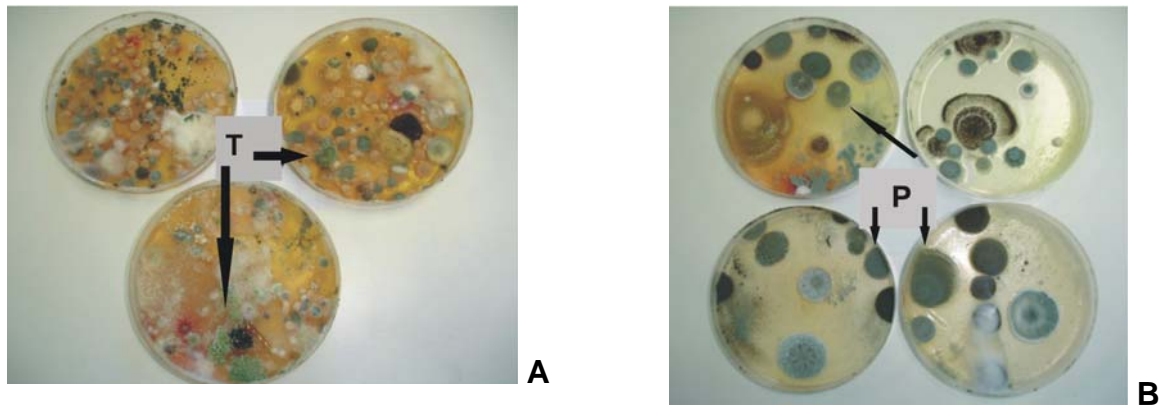


Figura 3.3- Diversidade de fungos em amostras de solo antes (A) e depois da desinfestação (B). Santa Maria, RS, 2005. T = *Trichoderma* e P = *Penicillium*.

Em relação ao número de UFC/g de solo, observou-se que, para *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. e outros gêneros fúngicos, houve diferença significativa entre as épocas de coleta de solo. Para *Trichoderma*, maio destacou-se com maior média ($3,12 \times 10^3$ UFC), seguido dos meses de julho ($1,62 \times 10^3$ UFC) e junho ($1,25 \times 10^3$ UFC). Para *Fusarium* e outros gêneros de fungos, maio destacou-se com os maiores valores de UFC/g de solo (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Número de UFC de *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. e outros gêneros fúngicos /g de solo nos meses de maio, junho e julho. Santa Maria, RS, 2005.

Época de coleta	UFC / g de solo		
	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	Outros fungos
Maio	3,12 x 10 ³ a *	10,48 x 10 ³ a	19,37 x 10 ³ a
Junho	1,25 x 10 ³ b	1,87 x 10 ³ b	11,25 x 10 ³ ab
Julho	1,62 x 10 ³ ab	0,75 x 10 ³ b	4,25 x 10 ³ b
C.V.	6,25	8,33	6,29

*Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste deTukey

De acordo com os dados obtidos, é possível observar redução no número de UFC/g de solo no mês de junho. Tal fato está relacionado à desinfestação do solo, uma vez que a biota do solo é fortemente afetada por essa prática. Para Barros (2006), o brometo de metila cria um “vácuo biológico”, uma vez que ele não elimina apenas insetos, fungos, bactérias e ervas daninhas, mas todo o ser vivo presente no solo. No entanto, a população de *Trichoderma* foi a menos afetada pela desinfestação do solo e foi a que mais rapidamente se restabeleceu. Tal fato corrobora com os estudos de Millhouse & Munneck (1981), nos quais *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. foram pioneiros e predominaram na nova composição da microbiota.

Na análise de regressão das diferentes doses do biopreparado de *Trichoderma* spp. aplicado no solo após a esterilização, pode-se observar que o comportamento do número de UFC/g de solo de *Trichoderma* sp. e de *Fusarium* sp. é representado por uma regressão linear (Figura 3.4).

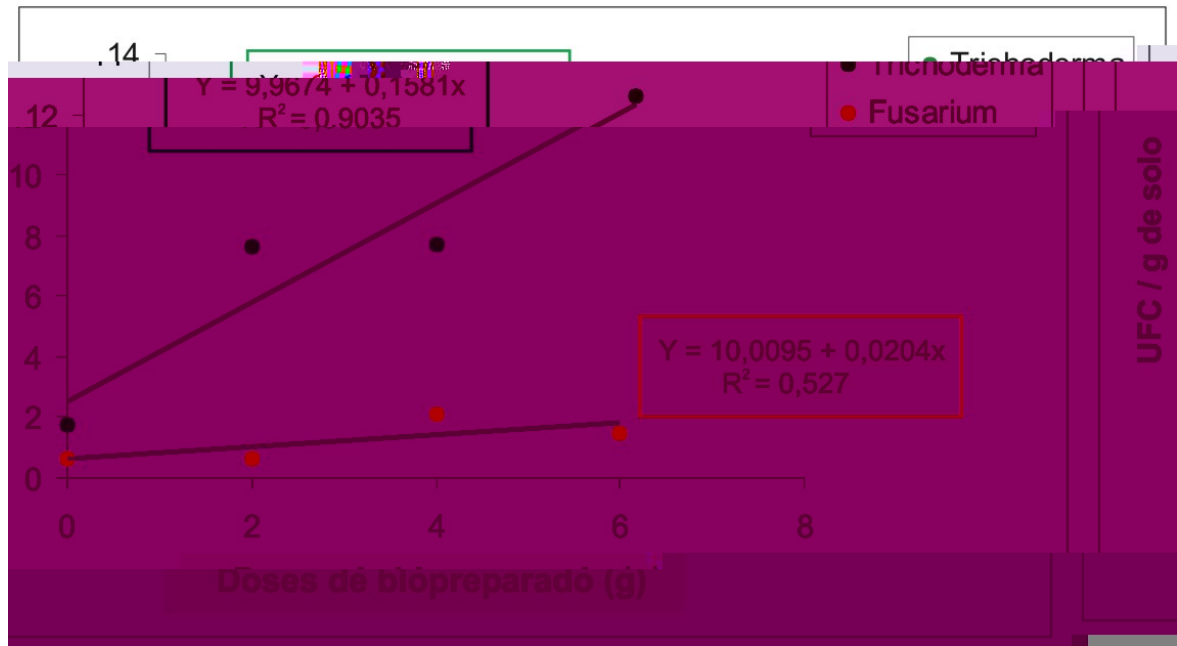


Figura 3.4- Número de UFC/g de solo de *Trichoderma* sp. e *Fusarium* sp. presentes em solo tratado com diferentes doses (0, 2, 4 e 6g) do biopreparado a base de *Trichoderma*. Santa Maria, RS, Julho de 2005.

Observou-se um crescimento linear de *Trichoderma* e *Fusarium* em função das doses do biopreparado utilizadas. Apesar disso, o número de UFC/g de solo de *Trichoderma* sp. foi sempre superior ao de *Fusarium* sp., indicando a habilidade desse fungo em se restabelecer e inibir o crescimento de *Fusarium*.

No que se refere ao número de UFC/g de solo de gêneros fúngicos totais, na análise de regressão, observou-se que o comportamento dessa variável pode ser representado por uma curva quadrática (Figura 3.5). Dos gêneros fúngicos encontrados, destacaram-se, além de *Trichoderma* sp. e *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Rhizopus* sp.

Para essa variável, o tratamento com 2g de biopreparado/m² promoveu o maior repovoamento com outros fungos, enquanto que as doses maiores apresentaram efeito menor. Assim, o ponto de máxima eficiência para essa variável foi de 2,9 g de biopreparado por m².

O número de fungos totais foi maior em todas as doses, exceto na dose de 6g, quando comparado com o número de UFC de *Trichoderma*.

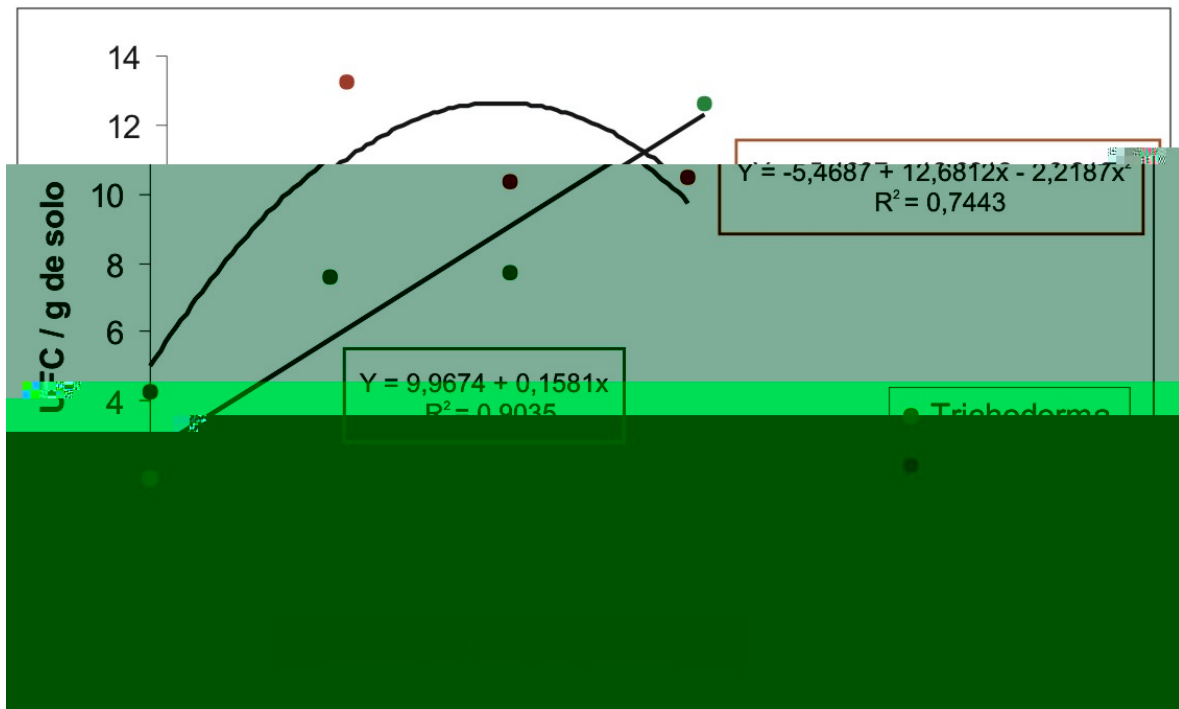


Figura 3.5- Número de UFC/g de solo de *Trichoderma* sp. e outros gêneros fúngicos presentes em solo tratado com biopreparado em diferentes doses. Santa Maria, RS, Julho de 2005.

É importante considerar também que após o povoamento do solo com *Trichoderma* sp. (aproximadamente 25 dias), através da incorporação do biopreparado em diferentes doses, observou-se a capacidade de sobrevivência desse gênero fúngico no solo. No tratamento controle (0g), o número de UFC de *Trichoderma* sp. manteve-se baixo e, em algumas repetições, não foi detectado.

Os dados referentes às médias mensais de temperatura ambiente e umidade relativa e temperatura do solo foram obtidos através da utilização de termohigrógrafo e geotermômetros, respectivamente (Figuras 3.6, 3.7 e 3.8).

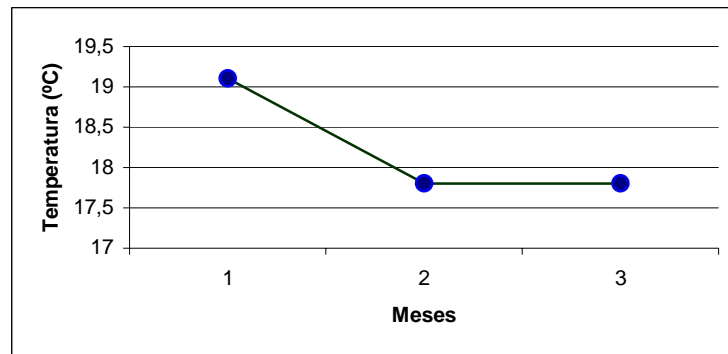


Figura 3.6- Média mensal de temperatura (1 = Maio, 2 = Junho e 3 = Julho).
Santa Maria, RS, 2005.

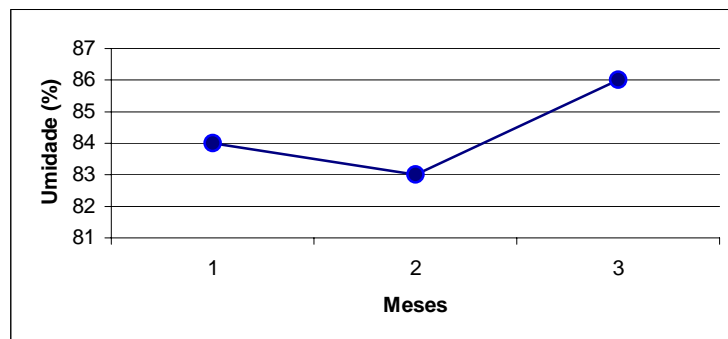


Figura 3.7- Média mensal de umidade relativa (1 = Maio, 2 = Junho e 3 = Julho).
Santa Maria, RS, 2005.

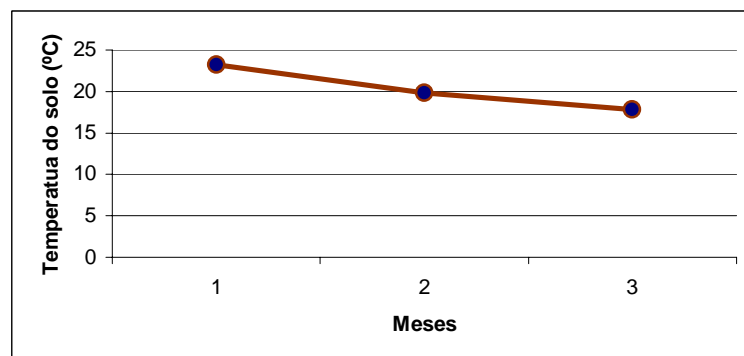


Figura 3.8- Média de temperatura do solo à 5 cm de profundidade e medida às 9:00h (1 = Maio, 2 = Junho e 3 = Julho). Santa Maria, RS, 2005.

Fatores ambientais como nutrição, pH, temperatura e umidade têm-se mostrado capazes de influenciar a microbiota do solo, bem como, o desempenho de agentes de biocontrole em condições de campo. Segundo Melo (1996), a umidade atua sobre populações de *Trichoderma* spp., as quais podem ser alteradas por solo

seco mantido por longos períodos. Porém, Liu e Baker (1980) observaram que espécies de *Trichoderma* não habitam solos com alto teor de umidade, embora Danielson & Davey (1973) tenham descoberto que certas linhagens de *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* são adaptadas às condições de umidade excessiva do solo. Em contrapartida, alta temperatura associada a altos teores de umidade do solo são fatores condicionantes para o surgimento de doenças, como a murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum* (HORST & NELSON, 1997).

Em relação à temperatura do solo, Widden & Hsu (1987) verificaram que *T. viride* e *T. polysporum* são restritos a áreas onde prevalecem baixas temperaturas (5 a 15°C) e que *T. harzianum* é encontrado com maior frequência em regiões de clima quente, enquanto que *T. hamatum* e *T. koningii* são amplamente distribuídos em áreas de diversas condições climáticas. Além disso, a baixa temperatura do solo observada no período entre maio e julho pode ter influenciado negativamente no crescimento populacional de *Fusarium* spp., uma vez que segundo Horst & Nelson (1997), para o desenvolvimento de *F. oxysporum* a amplitude térmica é de 27 a 32°C.

De acordo com Bernardes & Santos (2006), como meio para crescimento microbiano, o solo é um ambiente heterogêneo, descontínuo e estruturado. As práticas agrícolas alteram as características físicas, químicas e biológicas determinantes das condições de solo, influenciando as diversas populações na comunidade microbiana. Essas modificações refletem-se na composição, atividade e biomassa da comunidade microbiana, uma vez que a permanência de uma população no ecossistema fica condicionada à sua habilidade de adaptação e de resposta a mudanças ambientais (KIRCHNER et al., 1993; PEREIRA et al., 1996).

Nesse contexto, e de acordo com a análise das amostras de solo (Apêndice A), observou-se variação no pH das amostras de solo sem e com esterilização com brometo de metila (de 5,6 para 6,4). Em contrapartida, segundo Chet & Baker (1981), baixos níveis de pH aumentam a propagação de fungos, e de *Trichoderma* em especial, sugerindo, todavia, que a acidificação do solo pode induzir a supressividade de fitopatógenos.

Além disso, pode-se observar diferenças nos teores de cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe) e manganês (Mn). Houve aumento nos teores de Ca (de 10,6 para 12,9 cmol/dm³), Mg (de 4 para 4,2 cmol/dm³) e Mn (de 17,9 para 19,9 mg/dm³) no solo sem e com desinfestação, respectivamente. Em contrapartida, o teor de Fe

diminuiu com a esterilização (de 78,4 a 68,8 mg/dm³). É importante considerar que, segundo Melo (1996), *T. hamatum* encontrou dificuldades em se estabelecer no solo e em rizosfera de plantas desenvolvidas com pequenas quantidades de ferro.

Quanto ao teor de matéria orgânica, assim como o Ca, Mg e Mn, também se observou um aumento no solo esterilizado (de 2,1 a 2,3%).

Segundo Madsen (1995), as modificações no equilíbrio estabelecido entre as populações microbianas ocorrem principalmente em decorrência de alterações de pH, umidade, aeração temperatura e disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos, pelo efeito isolado ou do somatório de dois ou mais desses fatores.

3.4- CONCLUSÕES

- A desinfestação do solo com brometo de metila reduz a população microbiana de *Trichoderma*, *Fusarium* e outros gêneros fúngicos.
- O restabelecimento de *Trichoderma* sp., após a desinfestação, é mais rápido do que o de *Fusarium* e outros fungos.
- A incorporação do biopreparado no solo promove o crescimento populacional de *Trichoderma* sp.;
- A dose de 6g/m² do biopreparado promove maior crescimento de *Trichoderma* sp., enquanto que a dose de 2g/m² mantém a população de *Fusarium* sp. baixa e doses entre 2 e 4g promovem maior crescimento de fungos em geral.

3.5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BARROS, R. G. L. **Caldeiras para tratamento do solo substituem brometo de metila**. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/prozonesp/seminario>>. Acesso em: 20 jan. 2007.

BERNARDES, C. M.; SANTOS, M. A. dos. População microbiana como indicadora de interferência de diferentes manejos de solos de cerrado com cultivo de soja. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 2, p. 7-16. 2006.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPDA, 1991.

BIZI, R. M; GRIGOLETTI JR.; A; AUER, C. G. Seleção de Fungicidas para Controle de Oídio em Eucalipto. **Pesquisa Florestal**, v. 51, p.165-170. 2005.

CAPALBO, D. M. F.; NARDO, E. A. B. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agente de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. 2000. v. 2, p. 351-387.

CARTER, M. R. (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de Métodos de Análise de Solo**. v. 1. Rio de Janeiro, 1997.

FREITAS, T. M. Q. **Dano, dinâmica populacional e fontes de resistência genética a *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado no em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, p. 377-393. 2000.

HARMAN, G. E. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, p. 43-56. 2004.

HOMECHIN, M. Controle biológico de patógenos do solo. In Bettiol, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**, CNPDA-Embrapa. Jaguariúna, SP, p. 7-23, 1991.

HORST, R. K.; NELSON, P. E. **Compendium of chrysanthemum diseases**. St. Paul : APS Press, 1997. 62 p.

HOWEL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10. 2003.

KIRCHNER, M. J.; WOLLUM, A. G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Soil microbial populations and activities in reduced chemical input agroecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, v. 57, n. 5, p. 1289-1295. 1993.

LARANJEIRA, D. Situação atual do controle biológico de *Fusarium* spp. In: VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves : UFSM e EMBRAPA Uva e Vinho, 27 e 28 de novembro de 2001.

LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**. 1997. 87:1111-1117.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295.1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. Cap. 1. In: MELO, I. S. de.; AZEVEDO, J.L.de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA. 1998.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA. 2000. v. 3. 388 p.

MILHOUSE, D. E.; MUNNECKE, D. E. Effects of methyl bromide dosage on microorganisms in soil before and after growth of *Nicotiana glutinosa*. **Phytopathology**, v.71, n.4, p.418-421, 1981.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 434 p.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. **Quantificações de populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos**. Seropédica: Embrapa-CNPAB. 1996. 20 p.

PINTO, M. **Menos uma substância a prejudicar a camada de ozônio**. Disponível em : <<http://www.ambientebrasil.com.br/noticias/index.php3?action=ler&id=28993>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

SMITH, E.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VEEN, J. N. Risks associated with the application of genetically modified microorganisms in terrestrial environment. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 88, p. 263-278. 1992.

TEDESCO, M.J., GIANELLO, C., BISSANI, C., BOHEN, H. & VOLKSWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre : Departamento de

Solos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. Boletim Técnico, 5.

VÁSQUEZ, M. M. et al. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 261-272. 2000.

VENÂNCIO, W. S.; BUENO, C. J.; SOUZA, N. L. Efeito da solarização e do brometo de metila sobre a comunidade de fungos do solo. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 2, p. 183-185, 2006.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I – história, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 271-297. 1999.

ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado - Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: UFV, 2001. 722 p.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.D.; SILVEIRA JUNIOR,P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores: SANEST**. Pelotas: UFPEL, 1984. (Registro SEI nº 06606-0 categoria AO).

WIDDEN, P.; HSU, D. Competition between *Trichoderma* species: effects of temperature and litter type. **Soil Biological Biochemistry**, v. 19, p. 89-93. 1987.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS) DO rDNA DE *Trichoderma* sp. - ISOLADOS UFSMT15.1, UFSMT16 E UFSMT17

RESUMO

Várias espécies de fungos do gênero *Trichoderma* são potenciais agentes de biocontrole contra fitopatógenos do solo, como *T. harzianum*, *T. viride* e *T. hamatum*. Este trabalho teve por objetivo caracterizar a região do Espaço Interno Transcrito (ITS) do rDNA dos isolados dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp., oriundos de solo utilizado no cultivo de crisântemo em estufa. A extração de DNA de cada isolado foi realizada a partir de micélio produzido em meio líquido Batata-Dextrose (BD). Utilizaram-se as enzimas de restrição Hae III, Mbo I e Hinf I para digestão do DNA dos isolados de *Trichoderma* sp. As amostras de DNA genômico foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores universais ITS1 e ITS4, e seqüenciadas. As regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de micélio de *Trichoderma* sp. foi amplificada com sucesso com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4. A região do ITS dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp. apresenta uma banda simples com um fragmento de aproximadamente 600 pares de base (pb). As enzimas de restrição Hae III, Hinf I e Mbo I são eficientes na digestão do DNA genômico de *Trichoderma* spp., gerando polimorfismo de bandas que caracterizou os isolados. O isolado UFSMT17 possui 99% de similaridade filogenética com a espécie *Trichoderma aureoviride*. O isolado UFSMT16 possui similaridade de aproximadamente 93% com um grupamento constituído das espécies *Trichoderma hamatum*, *T. polysporum*, *T. koningii*, *T. viride* e *T. longipile*. O isolado T15.1 encontra-se em processo de sequenciamento.

Palavras-chave: DNA ribossomal e polimorfismo.

4.1- INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* possui espécies que são economicamente importantes devido à sua produção de enzimas e antibióticos. Além disso, algumas espécies têm sido relatadas como importantes na degradação de xenobióticos no solo (KINDERMANN et al., 1998). Várias espécies de fungos do gênero *Trichoderma* são agentes de biocontrole contra fitopatógenos do solo, como *T. harzianum*, *T. viride* e *T. hamatum*, mas ocasionalmente outras espécies têm sido citadas também (ARISAN-ATAC et al., 1995). Segundo Rifai (1969) apud Sariah et al. (2005), distinguiu-se nove espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma*, e dessas, *T. virens*, *T. harzianum* e *T. viride* têm sido reportadas como as mais comuns como agentes de biocontrole de fitopatógenos.

A taxonomia de *Trichoderma* é, geralmente, baseada em características morfológicas, tais como forma, tamanho, cor e ornamentação dos conídios; presença e forma de ramificações; e formação de alongações (estéreis ou férteis) dos conidióforos (RIFAI, 1969; BISSET, 1984). Entretanto, descrições das espécies são baseadas na análise de um número limitado de isolados, nos quais as diferenças morfológicas são poucas. Estudos mostram que a análise de características morfológicas e culturais não são suficientes para a definição das espécies de *Trichoderma* (FUJIMORI & OKUDA, 1994; ZIMAND et al., 1994).

Os métodos moleculares baseados na análise do ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA), têm sido ferramentas muito úteis nos estudos de filogenia de fungos e na diferenciação de espécies, *formae speciales*, raças e isolados (KURAMAE & SOUZA, 2002). Nesse contexto, a análise macromolecular baseada nos ácidos nucléicos tem sido usada para diferenciar entre e dentro dos agregados de *Trichoderma*, podendo demonstrar a diversidade genética de isolados individuais (HERMOSA et al., 2000).

O DNA ribossômico proporciona uma ferramenta importante para avaliação de polimorfismo nos fungos. Existem muitas cópias de rRNA como 17S, 5.8S, 25S e 5S, os quais são arranjados por espaços não codificados. As sequências codificadas do rRNA são altamente conservadas entre espécies de fungos em geral (MARQUES, 2003).

A identidade dos seres vivos é determinada pela composição e sequência do material genético. O uso de técnicas moleculares, através da análise de DNA, possui

a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível. Essas técnicas não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (MANSO, 1984). A diferenciação genética entre populações de uma espécie constitui o primeiro estágio da divergência evolutiva. Essa diferenciação resulta, na maioria dos casos, da ação de diferentes ambientes a que cada população está sujeita sobre a variabilidade pré-existente na espécie (MARQUES, 2003).

As enzimas de restrição também podem ser utilizadas, uma vez que reconhecem uma sequência de bases específicas na dupla-hélice do DNA e cortam ambas as fitas em lugares determinados. Estas enzimas são úteis na análise da estrutura dos cromossomos, sequenciamento de moléculas longas de DNA, isolamento de genes e na criação de moléculas novas de DNA que podem ser clonadas (PASSAGLIA & ZAHA, 2000). As técnicas conhecidas de diagnóstico molecular fundamentam-se na análise direta ou indireta da composição ou na sequência dos ácidos nucléicos para identificação e caracterização de organismos e características genéticas de interesse (MARQUES et al., 2002).

Uma das técnicas mais utilizadas em fungos é a amplificação da região do rDNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Essa técnica permite a amplificação de regiões específicas do genoma conservado (ITS – Internal Transcribed Spacer) localizadas em regiões altamente conservadas. A região do ITS é separada pelos genes 17S e 25S, podendo ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para essas duas unidades. O ITS é altamente conservado na espécie, mas é variável entre espécies, sendo frequentemente usado para taxonomia (BRUNS et al, 1991; ANTONIOLLI, 1998; ANTONIOLLI et al., 2000; GOMES et al. 2002).

A tecnologia de seqüenciamento mais amplamente utilizada combina a técnica da PCR com métodos de terminação de cadeias de dideoxynucleotídeos. Essa metodologia tem sido utilizada na identificação de microrganismos pela determinação da sequência de genes conservados. Após o seqüenciamento, softwares especializados realizam as análises filogenéticas, auxiliando na identificação dos organismos em estudo (LASERGENE, 1994).

Assim, este trabalho teve por objetivo caracterizar a região do ITS do rDNA e a diversidade de polimorfismo genético dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e

UFSMT17 de *Trichoderma* sp., os quais foram utilizados no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo.

4.2- MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados nos Laboratórios de Fitopatologia (Departamento de Defesa Fitossanitária) e de Biologia do Solo e Ambiente (Departamento de Solos), ambos do Centro de Ciências Rurais (CCR-UFSM) e Laboratório de Biologia Molecular (LabDros) do Departamento de Biologia do Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE-UFSM).

4.2.1- Obtenção e manutenção dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp.

Os três isolados de *Trichoderma* sp. foram obtidos a partir do teste de Confronto Direto (BELL et al., 1982), realizado entre 100 isolados de *Trichoderma* e um isolado *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* (Capítulo II).

Os isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp. foram multiplicados em meio de cultura líquido Batata-Dextrose (BD) (Anexo 6) por sete dias a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas em incubadora BOD.

4.2.2- Extração do DNA

A extração de DNA genômico de cada isolado foi realizada conforme metodologia de Sambrook et al. (1989), sendo o DNA extraído a partir de micélio produzido em meio líquido BD.

As suspensões micelianas, após serem retiradas do meio líquido com auxílio de um pinça esterilizada, foram secas em papel toalha e submetidas à maceração com

nitrogênio líquido até aparência de pó. Neste estágio, foi adicionado 600 µL de buffer CTAB 2% (100 mL de H₂O MiliQ, 8,183g de NaCl (1,4 M), 7,444g de EDTA (20 mM), 2g de CTAB (2%) e 1,576g de Tris-HCl (100 mM) a pH 8,0 e 1% de 2-β-mercaptoetanol) e novamente maceradas. Depois de maceradas, foram homogeneizadas em misturador por 1 min e incubadas em banho-maria a 65^oC por 1 hora. Depois de retiradas do banho-maria, foram adicionados às amostras 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1) e essas foram novamente submetidas à homogeneização em misturador por 5 min e centrifugadas a 18.894 rcf, rotor 12130 por 10 min a 15^oC em centrífuga Sigma Laboratory Centrifuge 4K15.

Após a centrifugação das três amostras, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionaram-se 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1) e foram centrifugadas a 18894 rcf por 10 min a 10^oC. O sobrenadante foi então retirado e adicionado a um novo tubo contendo 400 µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas novamente em misturador e os tubos permaneceram em temperatura ambiente por 5 min. Após este período, as mesmas foram centrifugadas a 18894 rcf por 10 min. Posteriormente, descartou-se o líquido sobrenadante e inverteu-se o tubo por 5 min para retirar todo o isopropanol. Ressuspendeu-se o pellet com 100 µL de etanol gelado (80%) e as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 5 min. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 18894 rcf por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se o etanol evaporar por 5 min. O pellet foi então ressuspenso em 50 µL de solução TE e armazenadas a -20^oC.

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com RNase. Adicionou-se às amostras 2% do volume da amostra de RNase e as mesmas permaneceram em banho-maria a 37^oC por 30 min.

Finalmente, o DNA foi analisado em gel de agarose 1,2%, sendo esse constituído de 100 mL de solução TBE (108g de Tris, 55g de ácido bórico, 40 mL de EDTA 0,5 M, 1L de H₂O MiliQ, pH 8,0) e 1,2g de agarose. Essa mistura foi dissolvida em forno de microondas e, após esfriar, adicionou-se 0,8 µL de brometo de etídeo para visualização da presença de DNA.

O gel foi corrido em cuba em voltagem de 70 mV (Fonte Consort E143). Depois de realizada a corrida do gel, esse foi visualizado em um transluminador ultravioleta

(Vilber Lourmat) e fotografado com câmara para fotografia de gel (Canon Power Shot S21S).

4.2.3- Digestão do DNA dos isolados de *Trichoderma* sp. com enzimas de restrição

O DNA de cada um dos três isolados de *Trichoderma* sp. foi submetido à digestão com as seguintes enzimas de restrição: Hae III, Mbo I e Hinf I (BioGen®) (Tabela 4.1), as quais foram selecionadas a partir do aplicativo MapDraw do software DNASTAR (LASERGENE, 1994).

Tabela 4.1- Enzimas de restrição e seus sítios de reconhecimento e clivagem utilizados na digestão do DNA dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp. Santa Maria, RS, 2006.

Enzima de restrição	Sítio de reconhecimento	Sítio de clivagem
Hae III	5' G G [^] C C 3' 3' C C [^] G G 5'	5'... GG [▽] CC... 3' 3'... CC [▲] GG... 5'
Mbo I	5' [^] G A T C 3' 3' C T A G [^] 5'	5'... [▽] GATC... 3' 3'... CTAG [▲] ... 5'
Hinf I	5' G [^] A N T C 3' 3' C T N A [^] G 5'	5'... G [▽] ANTC... 3' 3'... CTNAG [▲] ... 5'

Para cada enzima, 10 µL da solução de DNA de cada isolado foram colocados em um tubo microtubo estéril separadamente. Após, foram adicionados 1,5 µL do buffer de digestão (2 KGB) e 1 µL de enzima de restrição.

Posteriormente, adicionaram-se 7,5 µL de água ultra-pura, misturando-se levemente o material. A amostra foi centrifugada a 600 rpm por dois minutos e incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas.

Finalmente, cada amostra foi corada com 2 µL de corante (Loadyng buffer), constituído de 50% de glicerol, 0,2 M EDTA pH 8,3 e 0,05% de Bromofenol Blue, e, posteriormente, colocada em gel de agarose 1,2%, juntamente com 1 µL de marker

(1 Kb Plus DNA Leader – Gibco) e com 1 μ L do produto da digestão do DNA genômico com enzimas de restrição dos isolados de *Trichoderma* sp. para obtenção do polimorfismo de cada isolado.

O gel foi corrido em cuba em voltagem de 70 mV (Fonte Consort E143). Após a corrida, o gel foi visualizado em transluminador ultravioleta (Vilber Lourmat) e fotografado com câmara para fotografia de gel (Canon Power Shot S21S).

4.2.4- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de DNA genômico foram submetidas à PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a amplificação enzimática do DNA, sendo a reação realizada em um termociclador da MJ Research Inc. modelo PTC 100. Esse processo ocorreu *in vitro*, através de oligonucleotídeos iniciadores complementares às fitas opostas do DNA desejado. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados possuíam a seqüência de nucleotídeos ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990) para estudo da região do ITS (Figura 4.1).

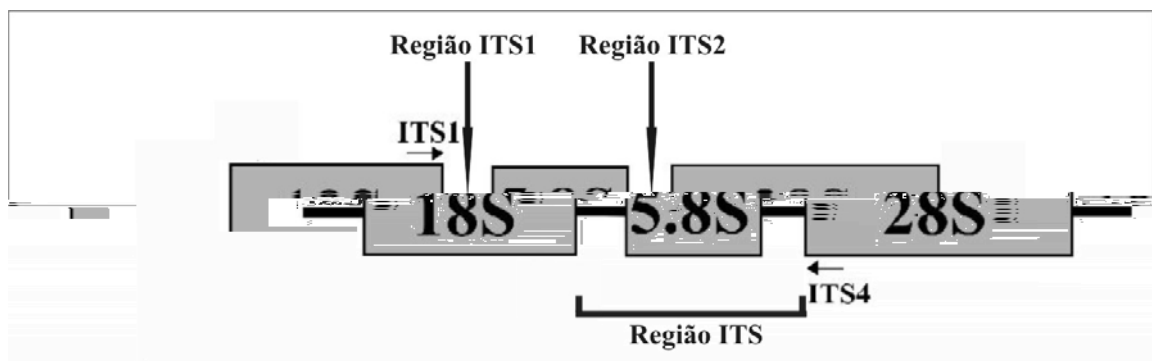


Figura 4.1- Representação esquemática da organização dos genes ribossomais (rDNA) em fungos. A posição dos iniciadores utilizados para amplificar e seqüenciar o rDNA de gêneros fúngicos estão indicadas. O gene ribossomal 5.8S RNA nesse grupo de organismos está localizado na região ITS (Adaptado de FIGUEIREDO et al., 2003).

Foi utilizada a seguinte reação da PCR: 1,0 µL de DNA; 2,5 µL de buffer; 3,0 µL de dNTP; 2,0 µL de MgCl₂; 3,0 µL do oligonucleotídeo iniciador ITS1; 3,0 µL do oligonucleotídeo iniciador ITS4; 0,5 unidade da enzima Taq polimerase (5 unidades/µL); 10,5 µL de água ultra-pura. Os ciclos da PCR seguiram as seguintes condições: primeira extensão a 94^oC por 3 min; desnaturação a 94^oC por 45 segundos; anelamento a 54^oC por 30 segundos; totalizando 30 ciclos seguidos por uma segunda extensão a 72^oC por 10 min e mantidas a 4^oC. Posteriormente, o material foi visualizado em gel de agarose 1,2% através de transluminador ultravioleta (Vilber Lourmat) e fotografado com câmara para fotografia de gel (Canon Power Shot S21S).

4.2.5- Purificação e seqüenciamento de DNA

As amostras obtidas na reação da PCR foram submetidas à purificação conforme metodologia descrita por Sambrook et al (1989). Juntamente com as amostras da PCR foi adicionado 1 volume de PEG 13% (10 mL de água ultra-pura, 1,3 g de PEG e 0,94 g de NaCl) e deixadas durante 16 horas na geladeira. Após serem retiradas da geladeira, as amostras foram centrifugadas a 18894 rcf por 15 minutos. A solução PEG 13% foi descartada e, após, foram acrescidos 200µL de álcool 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 18894 rcf durante 10 minutos. Após essa etapa, o álcool foi descartado e o DNA ressuspenso.

Para o seqüenciamento do DNA dos três isolados de *Trichoderma* sp., as amostras foram encaminhadas ao Laboratório LabDros. Após o sequenciamento no aparelho Mega BACE 500, as sequências obtidas foram editadas no aplicativo EditSeq e alinhadas no aplicativo MegaAlign do software DNASTAR (LASERGENE, 1994). Para a construção do diagrama de similaridade e a comparação da sequência consenso, foram utilizadas sequências obtidas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990), referentes a isolados de *Trichoderma* sp. (Tabela 4.2).

Tabela 4.2- Organismo e número de acesso dos isolados fúngicos utilizados na comparação de similaridade genética. Santa Maria, RS, 2006.

	Organismo	N° de acesso *	AUTOR
01	<i>Trichoderma longipile</i>	AY865630	DRUZHININA et al., 2005
02	<i>Trichoderma harzianum</i>	AY154948	ZAFARI, 2002
03	<i>Trichoderma harzianum</i>	AY027780	SAMUELS et al., 2002
04	<i>Trichoderma harzianum</i>	AF055213	DODD et al., 2000
05	<i>Trichoderma inhamatum</i>	AF414329	LEE & HSEU, 2002
06	<i>Trichoderma spirale</i>	AY857221	DRUZHININA et al., 2004
07	<i>Trichoderma aureoviride</i>	AF194015	LIECKFELDT et al., 1999
08	<i>Trichoderma rossicum</i>	DQ345859	SZEKERES et al., 2005
09	<i>Trichoderma virens</i>	AJ907781	SEIDL et al., 2006
10	<i>Trichoderma viride</i>	DQ845431	JAKLITSCH et al., 2006
11	<i>Trichoderma hamatum</i>	DQ888738	DEBELLIS et al., 2006
12	<i>Trichoderma koningii</i>	Z79628	LIECKFELDT et al, 1998
13	<i>Trichoderma stromaticum</i>	DQ083013	SAMUELS, 2005
14	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	AY291278	ZENG et al., 2003
15	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	DQ857347	DRUZHININA et al., 2006
16	<i>Trichoderma atroviride</i>	AJ912903	TrichoEST EUProject, 2002
17	<i>Trichoderma asperellum</i>	EF186002	BEGOUDE et al., 2006
18	<i>Trichoderma polysporum</i>	Z48815	KUHLS, 1996
19	<i>Hypocrea lixii</i>	AY605891	DRUZHININA et al., 2004
20	<i>Hypocrea rufa</i>	DQ845430	JAKLITSCH et al., 2006
21	UFSMT 16
22	UFSMT 17

* N° de acesso no National Center of Biotechnology Information (NCBI BLAST-
www.ncbi.nlm.nih.gov).

Após o alinhamento das sequências no aplicativo MegaAlign, as sequências com 98% de similaridade ou mais foram consideradas do mesmo grupo taxonômico.

4.2.6- Digestão das seqüências dos isolados UFSMT16 e UFSM17 e de *Trichoderma harzianum* através do aplicativo MapDraw do software DNASTAR

As seqüências obtidas dos isolados UFSMT16 e UFSM17 e de um isolado de *Trichoderma harzianum* (AF055213 – NCBI BLAST) foram digeridas pelas enzimas de restrição Hae III, Hinf I e Mbo I através do aplicativo MapDraw do programa DNASTAR (LASERGENE, 1994), para detecção de polimorfismo entre esses isolados.

Este recurso foi utilizado para comparação com a técnica de digestão enzimática do DNA dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp., uma vez que a migração do DNA no gel de agarose pode ser afetada pelos fatores tempo e voltagem da fonte, dificultando a separação e visualização das bandas geradas pela digestão enzimática.

4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1- Extração do DNA

Para os três isolados de *Trichoderma* sp. (UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17), a extração do DNA, segundo metodologia de Sambrook et al. (1989), mostrou-se eficiente, resultando em quantidade de DNA suficiente para a utilização de técnicas de purificação e análises de polimorfismo da região do ITS pelo sequenciamento direto do DNA do produto da PCR , bem como, para a digestão do mesmo com enzimas de restrição.

4.3.2- Digestão do DNA dos isolados de *Trichoderma* sp. com enzimas de restrição

As enzimas de restrição utilizadas (Hae III, Hinf I e Mbo I) foram eficientes na digestão do DNA dos isolados de *Trichoderma* sp. A digestão gerou um padrão de bandas de DNA semelhante entre os três isolados, sugerindo a possibilidade de que esses correspondessem a mesma espécie (Figura 4.2). O polimorfismo gerado pela enzima de restrição Hae III, formado por duas bandas nos três isolados estudados, auxilia na caracterização genética desses devido ao tamanho dos fragmentos gerados. Além disso, a enzima Hinf I clivou o DNA produzindo duas bandas com aproximadamente 400 e 100 bp. Em contrapartida, a enzima Mbo I gerou uma banda de DNA com aproximadamente 100 bp, porém, pode-se observar sensível diferença entre as bandas de cada isolado.

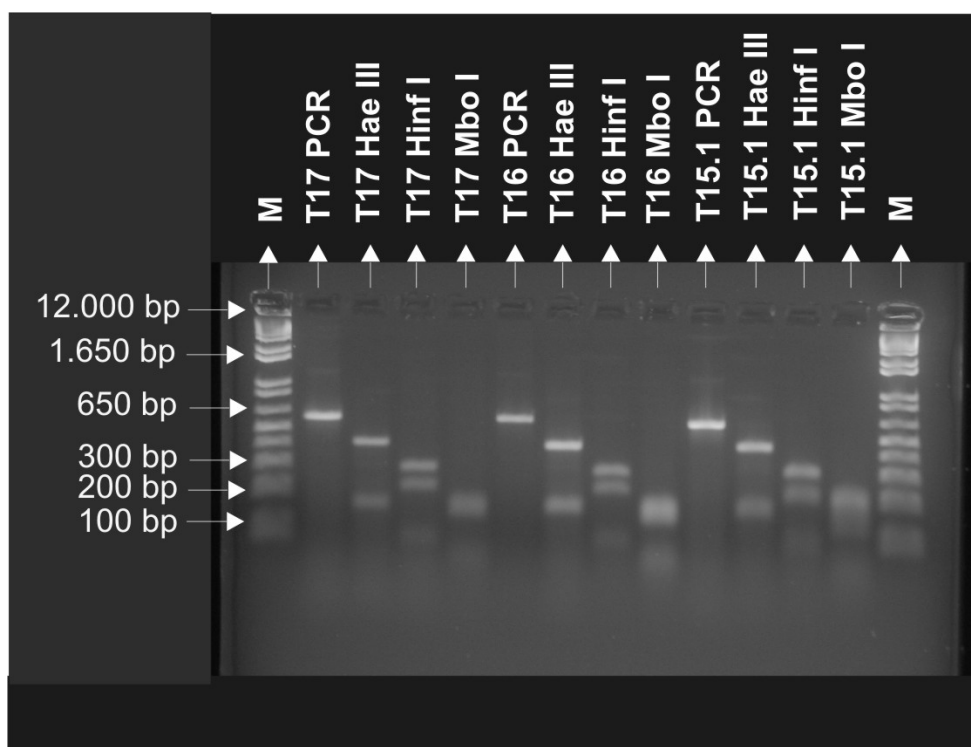


Figura 4.2- Produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da digestão enzimática com Hae III, Hinf I e Mbo I, respectivamente, dos isolados UFSMT17, UFSMT16 e UFSMT15.1 de *Trichoderma* sp. e Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco (M). Santa Maria, RS, 2006.

4.3.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de micélio de *Trichoderma* sp. obtido por meio de cultura foi amplificada com sucesso com os primers universais ITS1 e ITS4. A região do ITS dos isolados fúngicos mostrou uma banda simples com um fragmento de aproximadamente 600 pares de base (pb) (Figura 4.3), indicando a ausência de contaminação.

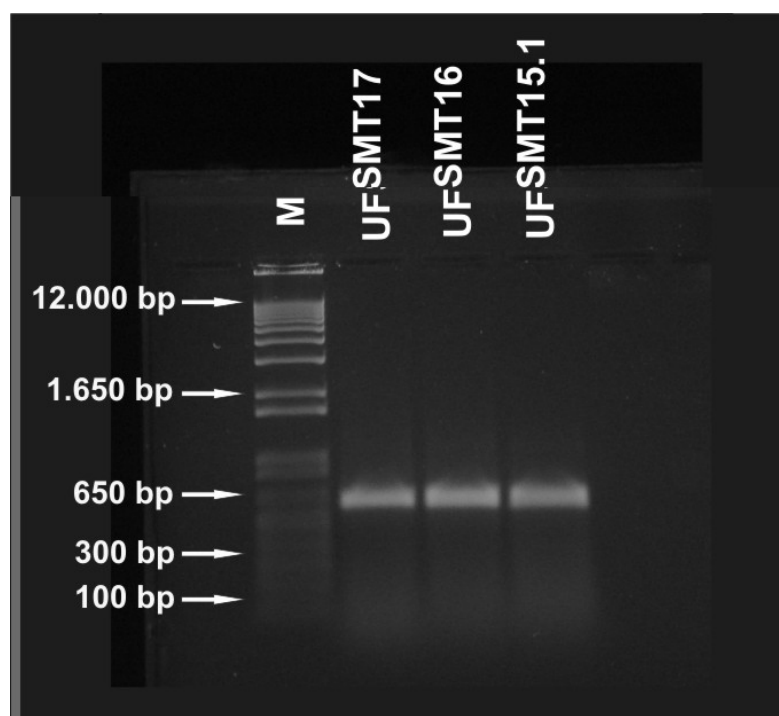


Figura 4.3- Produto da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos isolados UFSMT17, UFSMT16 e UFSMT15.1 de *Trichoderma* sp. M - Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco. Santa Maria, RS, 2006.

4.3.4- Seqüenciamento do DNA

No seqüenciamento, utilizou-se o produto direto da PCR de cada isolado e ambas as regiões do ITS (ITS1 e ITS2) foram seqüenciadas dos isolados UFSMT16 e UFSMT17. Já o produto da PCR do isolado UFSMT15.1 encontra-se no LabDros (UFSM) para seqüenciamento.

Comparando-se as sequências obtidas dos isolados de *Trichoderma* sp. com as informações da estrutura genética de outros isolados desse fungo disponibilizada no Banco de dados NCBI Blast, as sequências de genes conservados 5.8S, encontra-se entre os pares de bases 1 e 537 para UFSMT16 e 1 e 541 para UFSMT17 (Figuras 4.4 e 4.5).

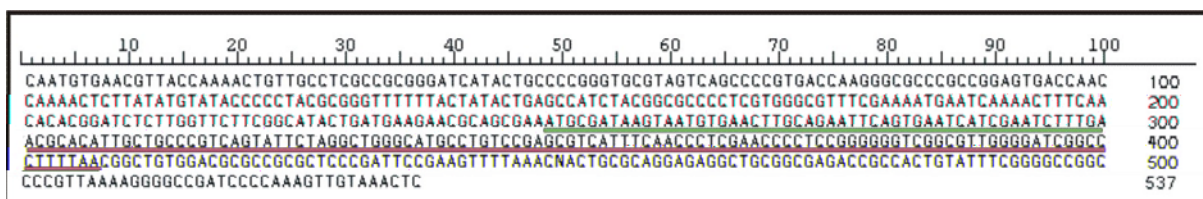


Figura 4.4- Sequência molecular do isolado UFSMT16 de *Trichoderma* sp. da região do ITS (Internal Transcript Spacer). Nucleotídeos sublinhados representam a região do 5.8S.

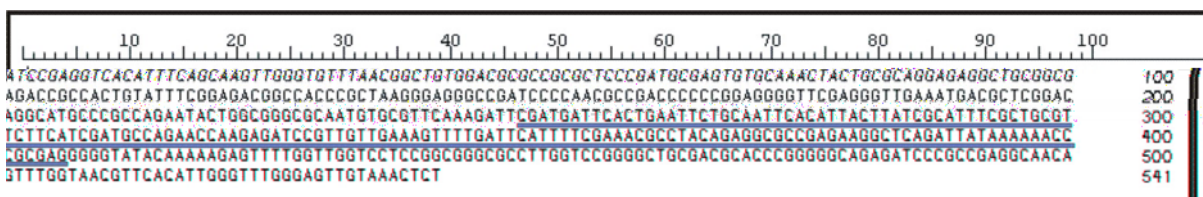


Figura 4.5- Sequência molecular do isolado UFSMT17 de *Trichoderma* sp. da região do ITS (Internal Transcript Spacer). Nucleotídeos sublinhados representam a região do 5.8S.

Para o isolado UFSMT16 de *Trichoderma*, a região 5.8S apresenta aproximadamente 90% de similaridade com a mesma região de um grupo filogenético constituído por isolados de *Trichoderma hamatum* (DQ888738), *T. polysporum* (Z48815) e *T. koningii* (Z79628) do Banco de Dados do NCBI BLAST (Figura 4.6).

Já, para o isolado UFSMT17, a região 5.8S apresenta 99% de similaridade com a mesma região de um isolado de *Trichoderma aureoviride* (AF194015) do Banco de Dados do NCBI BLAST, indicando que esse isolado pertence ao mesmo grupo taxonômico. Ainda, inserções e deleções indicam o nível de polimorfismo na sequência destas espécies dentro do gênero *Trichoderma* (Figura 4.6).


```

- - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G          - G A C C C A A G G - C G C Majority
      |              |              |              |
      130            140            150            160
69  - - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C AF055213. SEQ
112 - - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C AF194015. SEQ
63  - - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C AF414329. SEQ
116 - - C G T T T A T A C A A C - T T C T T T C C A C A T C A G C C A A A A T G C A A J3907781. SEQ
107 - - T G C C C C G G G - A A T - T C G G - - C C A T T A C G G C C G G G A - A C A A J3912903. SEQ
69  - - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C AZ027780. SEQ
110 - - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C AZ154948. SEQ
110 - - - - - - A A T A T - T T A A T T A T A A T T A A - - T A C T A AZ291278. SEQ
99  - - G A C T G G G A G T A C - C C T G C A G - A C G C C A C C C A G G C C T C - AZ605831. SEQ
50  - - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C AZ857221. SEQ
117 - - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C AZ865630. SEQ
80  - - T G C C C C G G G C G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C DQ083013. SEQ
83  A - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C DQ245859. SEQ
86  - - C C C T C G C A G C A T - C G C A C C C G C T T T G C C T G C C T - - C T DQ845430. SEQ
69  A - C G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C DQ845431. SEQ
70  - - - - C - - A A G C A C - C T G G T G A - A C - - - - C A G G T T C T - DQ857347. SEQ
65  A - T G C C C C G G G M G C G T C G - C A T C C C C G - G A C C C A A G G - C G M DQ888738. SEQ
112 - - T T T T C - C A G C G T - C - - A C C C G C T T T G C C A G T C T A C C T EFL186002. SEQ
44  A C T G C C C C G G G T G C G T A G T C A G C C C C G T G A C C C A A G G G C G C UFSM16. SEQ
41  - - T G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C UFSM17B. SEQ
114 A - T G C C C C G G G C G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C Z48815. SEQ
110 A - C G C C C C G G G T G C G T C G - C A G C C C C G - G A C C C A A G G - C G C Z79628. SEQ

```

```

C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T T T G T A T A C C C Majority
      |              |              |              |
      170            180            190            200
104 C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T T T G T A T A C C C AF055213. SEQ
147 C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T T T G T A T A C C C AF194015. SEQ
98  C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T T T G T A T A C C C AF414329. SEQ
153 A C T G T C C A A C A C T T T C A C T C T C G C C T C T T C A C T G C C - - G A J3907781. SEQ
140 T C A A C G C C A C G T T T A C A - - - - A A T T T C C T T T T G A C - - G A J3912903. SEQ
104 C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T T T G T A T A C C C AZ027780. SEQ
145 C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T T T G T A T A C C C AZ154948. SEQ
137 A A T C T T A A T C T A A C C T A T - - G G C A T T C A T C A T T T A C - - T G AZ291278. SEQ
134 - C A A C A T G G T T C T T C T G C T G A A G G A A G T C C G A T C T C A - - G AZ605831. SEQ
85  C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T - T G T A T A C C AZ857221. SEQ
152 C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T A T G T A T A C C AZ865630. SEQ
115 C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T A T G T A T A C C DQ083013. SEQ

```

```

99  C C G C C G G A G G - A C C A A C C C A A A A C T C T T - T T T G T A T A C C C DQ245859. SEQ
121 A C C C C T C A T T T T G C A C A G C A A A A A T T T T C T G G C T G T C T T G DQ845430. SEQ
105 C C G C C G G A G G G A C C A A C C - - A A A C T C T T - T C T G T A - G T C C DQ845431. SEQ
95  - G G A C A C - - - T C G T C - G C - - - - - A A G T C - - - - - - - - - - DQ857347. SEQ
91  C C G C C G G A G G - A C C A A C C C A A A A C T C T T - T - T G T A T A C C C DQ888738. SEQ
146 A C C C C T C C T T T G G C A C A G C A A A A A T T T T C T G G C T G C C T T G EFL186002. SEQ
84  C C G C C G G A G T G A C C A A C C - A A A A C T C T T A T A T G T A T A C C UFSM16. SEQ
76  C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T T T G T A T A C C UFSM17B. SEQ
150 C C G C C G G A G G - A C C A A C C - A A A A C T C T T - T - T G T A T G T C Z48815. SEQ
146 C C G C C G G A G G A C C A A C C - - A A A C T C T T - T C T G T A - G T C Z79628. SEQ

```

```

C C T - C G C G G G T T T T T T A T A A T C T G A G - C C T T C T - C G G C G C Majority
      |              |              |              |
      210            220            230            240
141 C C T - C G C G G G T T T T T T A T A A T C T G A G - C C T T C T - C G G C G C AF055213. SEQ
184 C C T - C G C G G G T T T T T T A T A A T C T G A G - C C T T C T - C G G C G C AF194015. SEQ
135 C C T - C G C G G G T T T T T T A T A A T C T G A G - C C T T C T - C G G C G C AF414329. SEQ
191 C C - - - G T C T C C G - - - - - - - - - - C G G A C A C T G T C T C T A C G A A J3907781. SEQ
173 C - - - - T T C T C A - - - - - - - - - - T A C G T A C A A T T G C A A G C A A A J3912903. SEQ
141 C A C T - C G C G G G T T T T T T A T A A T C T G A G - C C T T C T - C G G C G C AZ027780. SEQ
182 C C T - C G C G G G T T T T T T A T A A T C T G A G - C C T T C T - C G G C G C AZ154948. SEQ
173 C A A A - G A C T - - A C T T G G G T A T C T A A T C C T G T T T G T G - - - AZ291278. SEQ
171 C T - - - G G A T - - G - - - - - - - - - - C T A T G C T G C C C A G T A C G C AZ605831. SEQ
121 C C T - C G C G G G T T T T T T A T A - T C T G A G - C C A T C T - C G G C G C AZ857221. SEQ
189 C C T - C G C G G G T T T T T T A C A A T C T G A G - C C A T C T - C G G C G C AZ865630. SEQ
152 C C T - C G C G G G T T T T T T A C T - T C T G A G A C T T T C T - C G G C G C DQ083013. SEQ
137 C C T - C G C G G G T T T T T T A C T - T C T G A G A C T T T C T - C G G C G C DQ245859. SEQ
161 T T T G - G C T C T G A G T G G G G T G C C A C T T T T G T T G G C A G C G A DQ845430. SEQ
141 C C T - C G C G G A C G T T - - - - - A T T T - - - - - C T T - - - - - A C A G DQ845431. SEQ
114 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - DQ857347. SEQ
128 C C T - C G C G G G T T T T T T A T A T C T G A G - C C T T C T - C G G C G C DQ888738. SEQ
186 T T T G - G C T T T T A G T G G G G T G T C A A A T T T - T T G G C A G C A EFL186002. SEQ
123 C C T A C G C G G T T T T T T A C T A T A C T G A G C A C T C T A C G G C G C UFSM16. SEQ
113 C C T - C G C G G G T T T T T T A T A A T C T G A G - C C T T C T - C G G C G C UFSM17B. SEQ
186 C C T - C G C G G A C T T T T - A T A A T T C T G A C C A T C T - C G G C G C Z48815. SEQ
182 C C T - C G C G G A C G T T - - - - - A T T T - - - - - C T T - - - - - A C A G Z79628. SEQ

```

```

C T C T C - G T A G G C G T T T C G A A A A T G A A T C A A A A C T T T C A A C Majority
      |              |              |              |
      250            260            270            280
178 C T C T C - G T A G G C G T T T C G A A A A T G A A T C A A A A C T T T C A A C AF055213. SEQ
221 C T C T C - G T A G G C G T T T C G A A A A T G A A T C A A A A C T T T C A A C AF194015. SEQ

```

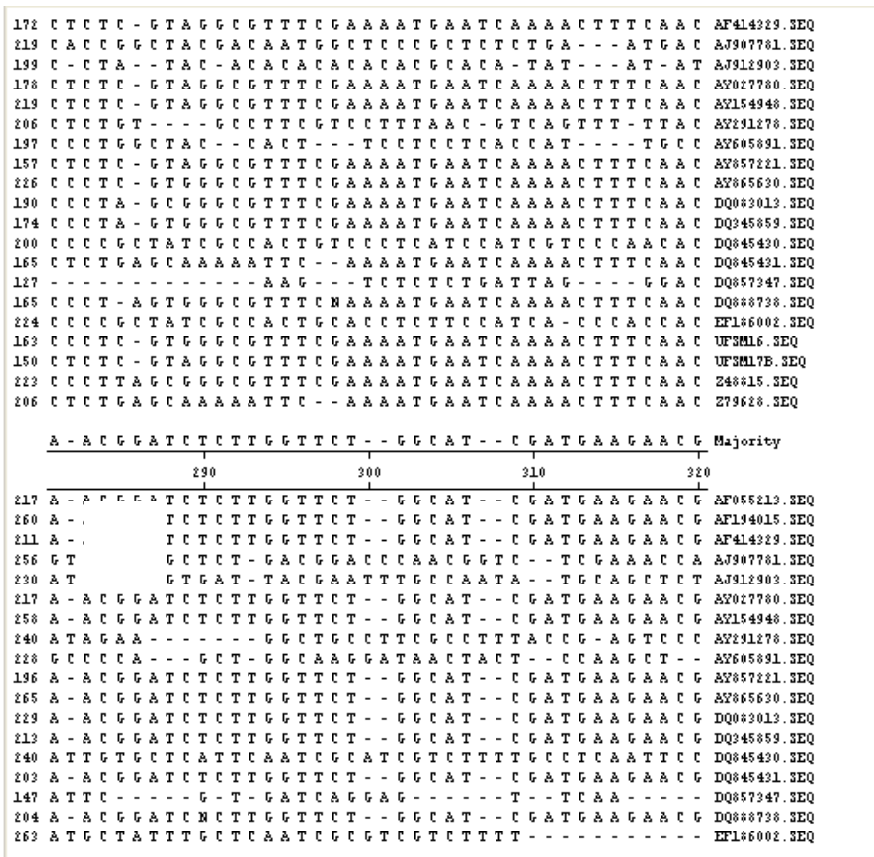


Figura 4.6- Múltiplo alinhamento das seqüências da região do ITS dos isolados UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp. (Ponto (.) indica que o nucleotídeo é igual à seqüência majoritária (consenso) e Traço (-) representa uma inserção ou deleção de nucleotídeo). Santa Maria, RS, 2006.

No dendrograma, é possível observar a formação de dois grandes grupos filogenéticos. Os isolados UFSMT16 e UFSMT17 encontram-se no mesmo grupamento, divergindo em 34,6% em relação ao outro grupo. Dentro deste grupamento, quanto à constituição gênica dos isolados utilizados na comparação, observou-se a formação de vários sub-grupos, sendo um desses constituído pelo isolado UFSMT17, *T. aureoviride* (AF194015) e *T. harzianum* (AY154948) (Figura 4.7).

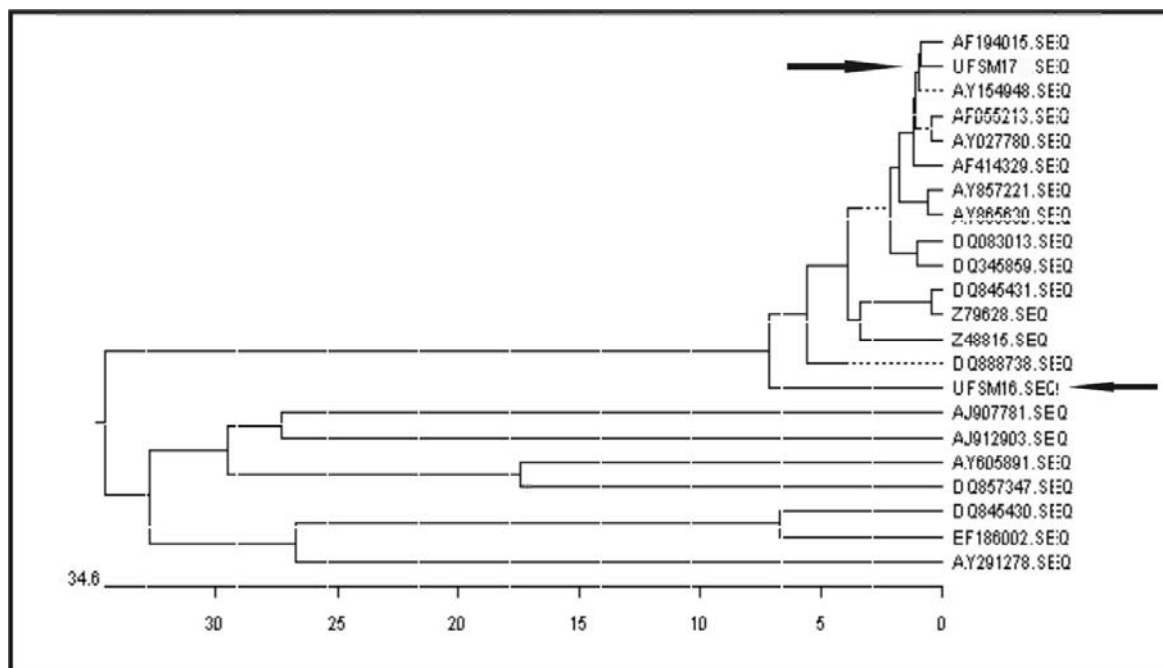


Figura 4.7- Dendrograma das distâncias genéticas entre UFSMT16, UFSMT17 e isolados de *Trichoderma* sp. provenientes do Banco de Dados do NCBI BLAST - AY865630 (DRUZHININA et al., 2005); AY154948 (ZAFARI, 2002); AY027780 (SAMUELS et al., 2002); AF055213 (DODD et al., 2000); AF414329 (LEE & HSEU, 2002); AY857221 (DRUZHININA et al., 2004); AF194015 (LIECKFELDT et al., 1999); DQ 345859 (SZEKERES et al., 2005); AJ907781 (SEIDL et al., 2006); DQ845431 (JAKLITSCH et al., 2006); DQ888738 (DEBELLIS et al., 2006); Z79628 (LIECKFELDT et al., 1998); DQ083013 (SAMUELS, 2005); AY291278 (ZENG et al., 2003); DQ857347 (DRUZHININA et al., 2006); AJ912903 (TrichoEST EU Project, 2002); EF186002 (BEGOUDE et al., 2006); Z48815 (KUHLS, 1996); AY605891 (DRUZHININA et al., 2004); DQ845430 (JAKLITSCH et al., 2006). Santa Maria, RS, 2006.

Segundo Melo & Peres (1995), a taxonomia, a genética e a composição da população de *Trichoderma* spp. não são ainda bem compreendidas e, portanto, são necessários métodos mais precisos para diferenciar linhagens de diferentes espécies para propósito de patente ou determinação de variabilidade de linhagens em ecossistemas naturais.

Devido à razoável similaridade genética do isolado UFSMT16 com os isolados testados, fazem-se necessários novos sequenciamentos com esse isolado, para a detecção de uma espécie de *Trichoderma* com maior similaridade. Porém, é possível

também que o isolado UFSMT16 ainda não apresente referência no NCBI BLAST ou seja um novo biotipo.

Em contrapartida, os resultados sugerem que a técnica de identificação através do sequenciamento direto do produto do PCR-ITS é eficiente para a separação de espécies de *Trichoderma*, uma vez que, a identificação morfológica não é suficiente para a definição de espécies (FUJIMORI & OKUDA, 1994; ZIMAND et al., 1994).

De acordo com Hermosa et al. (2000), as ferramentas moleculares utilizadas requerem quantidades mínimas de DNA e apresentam alta confiabilidade nos resultados, tornando-se assim um método excelente para estudo de populações nativas e monitoramento de isolados específicos utilizados em programas de inoculação com esses fungos nas mais diversas condições ambientais.

Assim, a análise macromolecular baseada nos ácidos nucléicos dos isolados UFSMT16 e UFSMT17 foi eficiente para diferenciar os isolados de *Trichoderma* sp., além de demonstrar a diversidade genética entre estes isolados.

4.3.5- Digestão das seqüências dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSM17 e de *Trichoderma harzianum* através do aplicativo MapDraw do software DANSTAR

Na digestão das seqüências dos isolados UFSMT16 e UFSM17 e de *Trichoderma harzianum* com as enzimas de restrição Hae III, Hinf I e Mbo I, foi possível observar polimorfismo entre os três isolados (Figura 4.8).

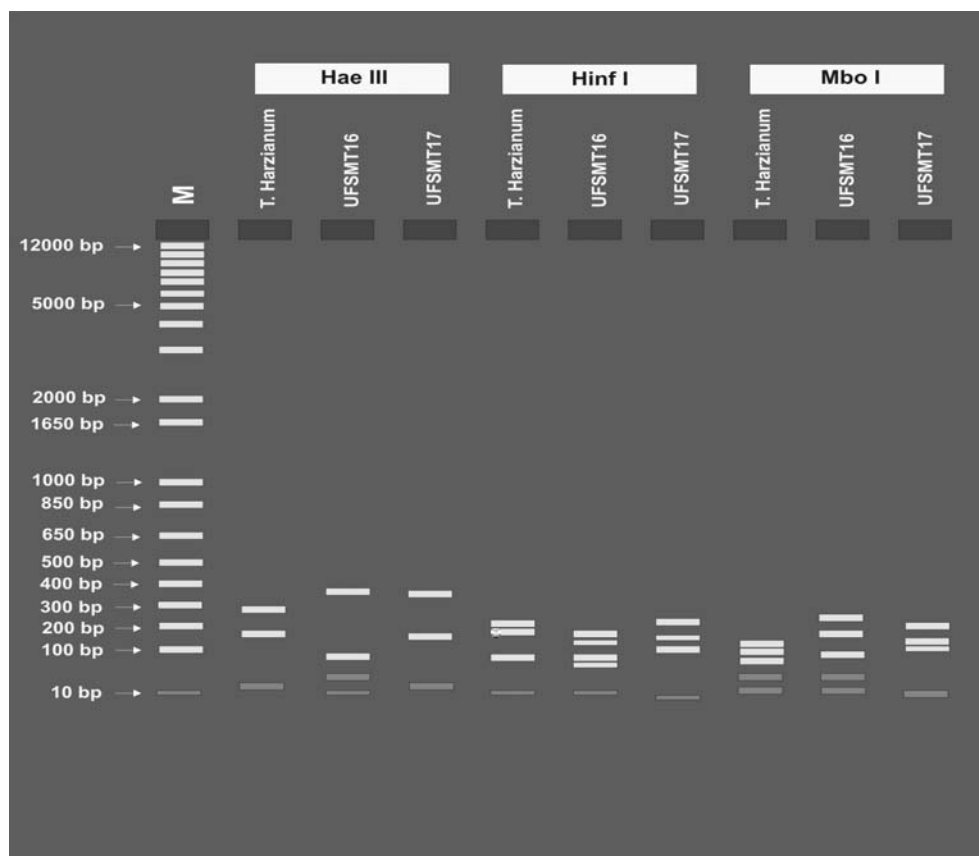


Figura 4.8- Representação esquemática do gel quando utilizadas as seqüências dos isolados AF055213* (*T. harzianum*), UFSMT16 e UFSMT17 após digestão do fragmento de DNA da região do Espaço Interno Transcrito (ITS) com as enzimas de restrição Hae III, Hinf I e Mbo I. M – Representação esquemática do marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco. * N° de acesso no NCBI BLAST – www.ncbi.nlm.nih.gov.

O padrão de bandas formados pelo aplicativo MapDraw indica que os três isolados de *Trichoderma* sp. são de espécies diferentes. É importante considerar que o padrão de bandas gerado neste aplicativo se assemelha ao padrão obtido na digestão enzimática, o qual foi visualizado através de gel de agarose 1,2%. Porém, no gel, não foi possível observar e distinguir os fragmentos com menos de 200 pares de bandas (bp).

4.4- CONCLUSÕES

- A região do ITS dos isolados UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 de *Trichoderma* sp. apresenta uma banda simples com um fragmento de aproximadamente 600 pares de base (pb);
- O isolado UFSMT17 possui 99% de similaridade filogenética com a espécie *Trichoderma aureoviride*;
- Os isolados de *Trichoderma* sp. UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17 apresentam polimorfismo diferente, quando se utiliza as enzimas de restrição Hae III, Hinf I e Mbo I.

4.5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFON, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**. v.25, p. 3389-3402. 1997.

ANTONIOLLI, Z.I.; SMITH, S. E.; OPHEL-KELLER, K.; SCHACHTMAN, D. P.; ZEZE, A. **Assessment of variation in sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* from a pasture communith.** In “Seconde International Conference on Mycorrhiza”. Uppsala, 1998.

ANTONIOLLI, Z. I.; SCHACHTMAN, D.; OPHELKELLER, D.; SMITH, S. E. et al. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture . **Mycological Research**. v. 104, n. 6, p. 708-715. 2000.

ARISAN-ATAC, I.; HEIDENREICH, E.; KUBICEK, C. P. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 126, p. 249-256. 1995.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma* sp. Sect. Longibrachiatum sect. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 924-931. 1984.

BRUNS, T.; WHITE, T.; TAYLOR, J. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecological Systematic**. n.22, p.525-564. 1991.

FIGUEIREDO, J. E. F.; de PAOLI, H. C.; COELHO, V. T. da S.; PINTO, N. F. J. de A. et al. **Caracterização molecular de microrganismos do ecossistema agrícola do Cerrado III – *Acremonium strictum***. Comunicado Técnico, n. 69, EMBRAPA Milho e Sorgo, 10 p. 2003.

FUJIMORI, F.; OKUDA, T. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening fungi. **Antibiotic Journal**, v. 47, p. 173-182. 1994.

GOMES, E.A.; KASUYA, M.C.M.; BARROS, E.G.; BORGES, A.C. et al. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**. v.25, n.4, p.477-483. 2002.

HENTZ, A. H. Qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis* hillex maiden e *Acacia mearnsii* de wild inoculadas com fungos micorrízicos. **2006, 143f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria: 2006.**

HERMOSA, M. R. et al. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1890-1898. 2000.

KINDERMANN, J.; EL-AYOUTI, Y.; SAMUELS, G. J. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer Region 1 of the rDNA cluster. **Fungal genetics and Biology**, v. 24, p. 298-309. 1998.

KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1481-1485. 2002.

LASERGENE. **User's guide. A manual for the Lasergene System**. Biocomputing software for windows. 253p. 1994.

MANSO, S.B.G.; TENENTE, R.C.V. **Nematóides (*Heterodera glycines* Ichinohe) formador do cisto da soja**. Brasília, DF; EMBRAPA – CENARGEM (Comunicado Técnico), 5 p. 1984.

MARQUES, E. K. Diagnóstico genético molecular. Canoas: Ed. ULBRA, 372p. 2003.

MARQUES, E. K.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A. S. K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. De.; AZEVEDO, J. L. De. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433p.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. **Técnicas de DNA recombinante**. In: Zaha, A. (Coord.). *Biologia Molecular Básica*. 2. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2000. 336 p.

PERES, E.; MELO, I S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I – Aspectos citológicos. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 1, p. 56-59, 1995.

RIFAI, M. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v.116, p.1-116. 1969.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SARIAH, M.; CHOO, C. W.; ZAKARIA, H.; NORIHAN, M. S. et al. Quantification and characterization of *Trichoderma* spp. from different ecosystems. **Mycopathologia**, v. 159, p. 113-117. 2005.

ZIMAND, G.; VALINSKI, L.; ELAD, Y.; CHET, I.; MANULIS, S. Use of RAPD procedure for identification of *Trichoderma* strains. **Mycological Review**, v. 98, p. 531-534. 1994.

WHITE, T.; BRUNS, T., LEE, S., and TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols – A guide to methods and applications**. New York: Academic Press. p. 315 – 322. 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que:

- A utilização de isolados de *Trichoderma* spp. nativos pode trazer resultados positivos no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*;
- Os três isolados de *Trichoderma* sp. (UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17) selecionados reduzem a incidência da murcha por *Fusarium* em crisântemo;
- A desinfestação do solo com brometo de metila reduz consideravelmente a população microbiana;
- O povoamento do solo com *Trichoderma* spp. auxilia na recolonização do solo com fungos dessa espécie e também com outros gêneros fúngicos;
- *Trichoderma* sp. é capaz de sobreviver em substrato comercial e pode ser encontrado associado às raízes de crisântemo;
- O biocontrole e a menor incidência da murcha por *Fusarium* sp. podem estar relacionados com a capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. encontrarem-se associados às raízes de crisântemo;
- A caracterização molecular da região do ITS do rDNA dos três isolados de *Trichoderma* sp. (UFSMT15.1, UFSMT16 e UFSMT17) indica que correspondem a espécies diferentes.

Ações de pesquisa:

Controle biológico da murcha causada por *Fusarium oxysporum* em crisântemo através de:

- Incorporação, no solo, de mix de isolados nativos de *Trichoderma* sp.;
- Diferentes doses de bioprodutos fabricados a partir dos isolados nativos e também dos bioprotetores comerciais;
- Tratamento de mudas com os bioprotetores antes do transplante;
- Marcação de isolados de *Trichoderma* sp. e monitoramento de sua população no agroecossistema;
- Ação dos isolados de *Trichoderma* sp. na absorção de nutrientes e crescimento vegetal de plantas de crisântemo;

Além disso,

- Testar os isolados de *Trichoderma* sp. no biocontrole de outros fitopatógenos;
- Identificação dos isolados de *Trichoderma* sp. através da caracterização molecular da região do ITS do rDNA, bem como, criação de oligonucleotídeos iniciadores específicos para os isolados e/ou biótipos encontrados.
- Testar outros isolados de *Trichoderma* sp. quanto à segurança para mamíferos.

ANEXO 1

TOXICOLOGIA DO BIOPREPARADO A BASE DE *Trichoderma* sp. (ISOLADO UFSMT17) ADMINISTRADO EM MAMÍFERO

RESUMO

Os fungos são, provavelmente, a maior promessa no biocontrole de doenças de plantas. Vários fatores atuam na demanda por esses produtos além de sua eficácia, tais como a regulamentação de seu uso, a relação custo/benefício, o manejo adotado pelo agricultor e a segurança do bioproduto. Nesse contexto, a avaliação de risco ecotoxicológico tem crescido em importância no estudo da natureza e magnitude dos impactos ecológicos e na saúde humana da utilização de bioprotetores. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da administração de suspensões de *Trichoderma* sp. (isolado UFSMT17) em organismo não-alvo (rato) para observação de sintomas adversos, bem como, para detecção da germinação de conídios desse fungo nos tecidos do animal. A administração da dose desafio de *Trichoderma* sp. (UFSMT17) nos ratos foi realizada através de sonda gástrica. Uma hora após a administração, os animais foram sacrificados e as amostras de rim, fígado e sangue foram devidamente homogeneizadas em solução salina 0,9%. Cada amostra foi submetida a diluições seriadas em solução salina esterilizada e plaqueada em meio de cultura BDA. Além disso, foram confeccionadas lâminas para detecção de esporos do fungo nas amostras e para avaliação em Câmara de Neubauer. Após incubação por sete dias, realizou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias encontradas nas amostras plaqueadas. Nos ratos tratados com *Trichoderma* sp., não foram encontrados conídios viáveis do fungo nos tecidos amostrados. Nas lâminas de sangue, rim e fígado não foram detectados conídios de *Trichoderma* sp., porém *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.; *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. foram encontrados em todos os ratos nas amostras de sangue, rim e fígado.

Palavras-chave: Análise de risco e ratos.

1- INTRODUÇÃO

Os agentes microbianos para o controle de doenças e pragas são organismos que estão presentes no ambiente e que, geralmente, são muito mais seletivos que os pesticidas químicos. Entretanto, apesar da segurança esperada, eles também apresentam propriedades que podem causar danos ambientais e à saúde humana. Por serem organismos vivos, apresentam o potencial de persistir, multiplicar e disseminar no ambiente e de infectar e causar doenças em outros organismos. Esta habilidade dos agentes microbianos de controle (AMCs) de infectar outros hospedeiros, além do organismo-alvo é o assunto mais importante relacionado à segurança de uso de microrganismos como agentes de controle biológico (CASTRO et al., 2001; URI, 1999).

A adoção de um AMC implica na possibilidade de sua ampla distribuição ambiental e, conseqüentemente, a exposição de outros organismos não-alvo, além da própria praga ou doença que se deseja controlar. Mesmo que o AMC seja de ocorrência natural na região de utilização do produto, este possivelmente estará disponível durante a aplicação de forma numérica, espacial e temporal diferente da usual, surgindo daí a necessidade de uma avaliação do risco do uso desses agentes (MELO, 1998; BRAZNER & ANDERSON, 1986; GENTHNER, et al., 1995).

Sabe-se que o controle biológico, pela exploração do antagonismo e competição de microrganismos, é possivelmente uma boa estratégia para o controle de doenças em plantas (BRAVO & HEDGER, 1988). Os microrganismos usados como biopesticidas, em sua grande maioria, são considerados como potencialmente seguros. Entretanto, a avaliação de risco tem crescido de importância no estudo da natureza e magnitude dos impactos ecológicos e na saúde humana.

Nesse contexto, se tem observado que espécies de *Trichoderma* limitam o crescimento de muitos fungos fitopatogênicos nas folhas e nas raízes. O fungo antagonista, inclusive *Trichoderma* sp., é capaz de interferir nos processos de vida do fitopatógeno através de antibiose, competição e parasitismo. *Trichoderma* sp. e outros gêneros fúngicos, apesar de serem considerados seguros e não agressivos ao meio ambiente e a organismos não-alvo, ainda são insuficientes as informações técnicas sobre seus efeitos (MELO, 1998; CHET, 1987).

Genthner & Middaugh (1995) observaram que a exposição de embriões e larvas do peixe *Menidia beryllina* ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

desencadeou efeitos adversos como comprometimento cardíaco, ruptura do córion, anormalidades esqueléticas e expressão teratogênica. Ainda, Nestrud & Anderson (1994) detectaram que a utilização do fungo entomopatogênico *Lagenidium giganteum*, eficiente no controle de mosquitos, também atinge algumas espécies aquáticas não-alvo.

O monitoramento dos agentes antagônicos liberados a campo é de fundamental importância para a avaliação do impacto destes sobre os demais organismos presentes na área tratada e o estudo do impacto sobre organismos não-alvo é necessário para que a eficiência do agente antagonista seja comprovada em termos de segurança ambiental (MELO, 1998).

De acordo com Castro et al. (2001), a avaliação de impacto decorrente do uso dos biopesticidas requer conhecimento do produto e seus metabólitos, da sua interação com os alvos específicos e com o ambiente onde este será aplicado. Os estudos ecotoxicopatológicos a respeito do risco de um biopesticida devem ser conduzidos com uma dose desafio maior do que aquela usada a campo.

Atualmente, os impactos ambientais causados por biopesticidas, são estimados através de testes que utilizam uma dose desafio do biopesticida, considerada de risco máximo (100 a 1000 vezes a dose utilizada a campo). Já os testes usados para a avaliação destes agentes em relação à saúde humana, para avaliar a toxicidade, patogenicidade e infectividade do produto; são baseados na extrapolação de resultados interespecies entre a espécie escolhida, geralmente um roedor, e o homem. Para tanto, testa-se em animais de laboratório a administração de uma dose desafio ao redor de 1×10^8 unidades infectantes do produto (JONSSON & MAIA, 1999; CASTRO et al., 1999).

A avaliação de possíveis riscos a organismos não-alvos é geralmente realizada em um sistema de fases subseqüentes. Na Fase I, o conceito de risco máximo baseia-se na pior situação de exposição, em termos de dose, o que permitiria utilizar o mínimo necessário de dados para estabelecer a segurança do produto e com isso diminuir os custos para tanto. Caso sejam observadas quaisquer evidências de patogenicidade e/ou toxicidade, passa-se aos testes da fase seguinte até um máximo de três fases para testes referentes à saúde humana em roedores e quatro fases para organismos aquáticos (MELO, 1998).

Na avaliação toxicológica em animais de laboratório, também se segue o esquema de fases, onde o protocolo estabelece diretrizes para a condução de testes

com mamíferos, com a finalidade de se avaliar o potencial de efeitos indesejáveis causados por agentes microbianos de controle (AMC). Esses testes devem ser conduzidos em uma seqüência de três fases, considerando-se a infectividade, a toxicidade e a patogenicidade do microrganismo, de contaminantes microbianos e subprodutos de fabricação (PESTICIDE, 1989; CASTRO et al., 2001; CASTRO et al., 1999).

Os organismos utilizados como indicadores de efeitos adversos para AMCs são geralmente os mesmos utilizados para os testes com pesticidas químicos. Quando possível, devem ser espécies representativas da região geográfica ou ecossistema em que o AMC será aplicado, principalmente espécies que mais provavelmente irão estar expostas ou se alimentar dos organismos-alvo quando estiverem infectados ou mortos (GENTHNER, 1995; JONSSON & GENTHNER, 1997).

Para fins práticos, entretanto, a escolha de indicadores biológicos é baseada principalmente na facilidade de criação, reprodução artificial, manutenção e manipulação, devendo incluir representantes do ambiente terrestre (artrópodos benéficos, plantas e aves) e do ambiente aquático (peixes, invertebrados e algas) (MELO, 1998).

Portanto, é importante considerar que os produtos biológicos desenvolvidos para o controle de doenças de plantas devem ser bem avaliados, não apenas com relação aos benefícios que oferecem, mas, sobretudo, à segurança, ou seja, o potencial de risco envolvido em seu emprego.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da administração de suspensões de *Trichoderma* sp. em organismo não-alvo (rato) para observação de sintomas adversos, bem como, para detecção da germinação de conídios desse fungo nos tecidos do animal.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados nos Laboratórios de Fitopatologia (Departamento de Defesa Fitossanitária – Centro de Ciências Rurais - CCR) e de Bioquímica Toxicológica (Departamento de Bioquímica – Centro de Ciências Naturais e Exatas - CCNE) ambos da Universidade Federal de Santa Maria.

2.1- Fabricação do biopreparado de *Trichoderma* sp.

O isolado de *Trichoderma* sp. foi obtido a partir do teste de Confronto Direto, realizado entre isolados de *Trichoderma* e *Fusarium oxysporum*, provenientes de amostras de solo coletadas em estufa com cultivo de crisântemo (Capítulos I e II).

O isolado UFSMT17 de *Trichoderma* sp. foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Anexo 1) por sete dias a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas em incubadora BOD.

No preparo do biopreparado, 50 g de grãos de arroz e 25 mL de água destilada foram colocados em erlenmeyers de 250 mL. Esterilizados por três vezes em autoclave a 120°C (1 atm) por 40 min. Posteriormente, quatro discos de BDA de 12 mm de diâmetro contendo micélio e/ou esporos (incubados por uma semana) do isolado de *Trichoderma* sp. foram incorporados ao substrato.

Após 20 dias, o substrato foi retirado do erlenmeyer, colocado em envelopes de papel, e levado ao forno por aproximadamente 72 horas a 30°C (\pm 5°C). Após a secagem, o substrato foi triturado em liquidificador até obter-se um material fino e homogêneo.

2.2- Preparo dos ratos

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, de aproximadamente 150 g de peso, de 50 a 60 dias de idade, provenientes do Biotério da UFSM. Os animais foram mantidos em gaiolas com palha em condições padronizadas de luz (ciclo claro/escuro 12h) e temperatura (22 \pm 2° C) e, uma semana antes da instalação do

experimento, foram levados para o biotério do prédio 19 do CCNE. Diariamente, os animais foram alimentados e hidratados. Foram utilizadas gaiolas constituídas de uma bandeja plástica (0,80 x 0,40 x 0,30 m) e de uma tela metálica que servia de suporte para ração e água.

2.3- Preparo do biopreparado de *Trichoderma* para administração nos ratos

O biopreparado de *Trichoderma* sp. do isolado UFSMT17, na concentração de $6,31 \times 10^6$ esporos/mL, foi diluído em água destilada esterilizada e, para a obtenção da dose desafio (Teste da Fase I), utilizou-se Câmara de Neubauer para contagem do número de esporos/mL de suspensão até atingir $6,31 \times 10^8$. Para ajuste da concentração do mesmo pela fórmula: $V_f = V_i \times C_e / C_d$. Onde, V_f = volume final da suspensão, V_i = volume inicial conhecido da suspensão, C_e = concentração de esporos encontrada na Câmara de Neubauer, e C_d = concentração de esporos desejada (FERNANDEZ, 1993).

2.4- Administração da solução do biopreparado de *Trichoderma* nos ratos

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), onde a dose desafio do biopreparado do isolado UFSMT17 foi administrada em três tratamentos com três repetições, totalizando nove ratos (Tabela 1).

Tabela 1- Tratamentos utilizados no teste de toxicologia do biopreparado de *Trichoderma* sp. (UFSMT17) administrado em ratos. Santa Maria, RS, 2006.

Tratamentos		Ratos
Fungo ativo (AT)	Biopreparado viável	1, 2 e 3
Fungo inativado (IN)	Biopreparado inviável	4, 5 e 6
Controle (CT)	Sem biopreparado, somente soro fisiológico	7, 8 e 9

A dose desafio foi administrada nos ratos em suspensões de $6,31 \times 10^8$ esporos/mL pela via oral através de sonda gástrica acoplada a seringa de 1 mL (Figura 1). Os volumes administrados por animal teste foram de 0,5 mL/100 g de peso.

O fungo inativado foi obtido mediante esterilização da solução do biopreparado em autoclave a 120°C (1 atm) por 30 min. A água e a ração dos ratos foram retiradas 16 horas antes da administração dos tratamentos.

Durante uma hora os animais foram observados quanto à ocorrência de alterações no pêlo e nos olhos, assim como tremor, diarreias, convulsão, letargia e salivação.

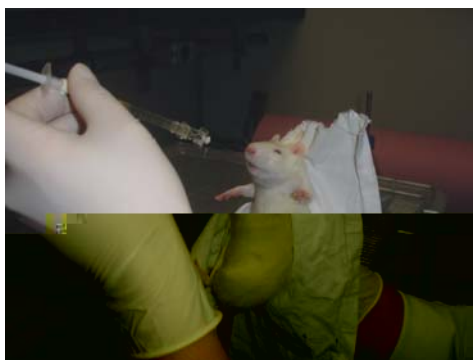


Figura 1- Administração da solução do biopreparado do isolado UFSMT17 de *Trichoderma* sp. via oral através de sonda gástrica. Santa Maria, RS, 2006.

Todos os animais foram sacrificados ao final dos testes em um recipiente de plástico com algodão embebido em clorofórmio e submetidos à necropsia com observação macroscópica dos órgãos (Figura 2-A). Os animais foram sacrificados no dia da administração, uma hora após a administração, com a retirada dos rins, fígado e sangue para verificar a presença do fungo nesses órgãos e tecido. Tanto a administração do biopreparado como o sacrifício dos animais foram realizados com 10 minutos de intervalo entre cada rato.

O sangue foi punccionado do coração com auxílio de seringa heparinizada de 5 mL enquanto os animais encontravam-se anestesiados (Figura 2-B).

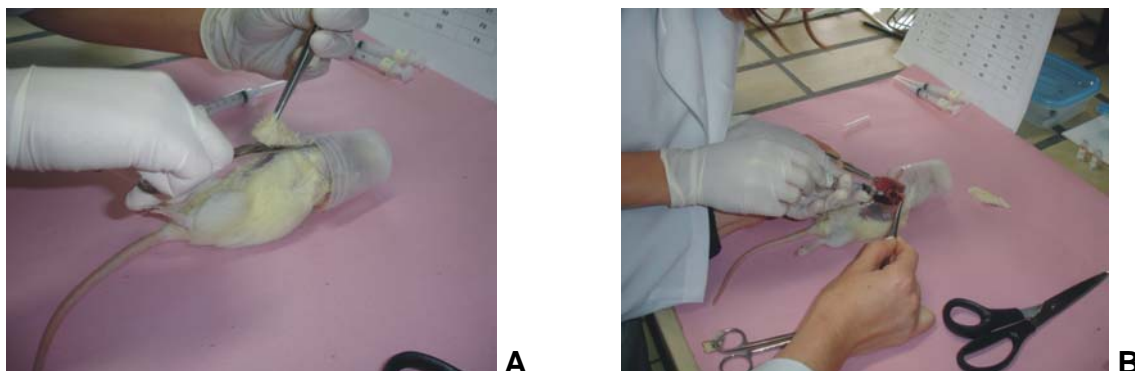


Figura 2- A) Rato anestesiado com algodão embebido em clorofórmio e submetido à necropsia. B) Sangue sendo punsionado do coração com auxílio de seringa heparinizada de 5 mL. Santa Maria, RS, 2006.

Rins e fígado foram retirados com auxílio de tesouras e pinças esterilizadas, foram pesados individualmente e homogeneizados com solução salina (NaCl 0,9%), sendo utilizados 10 mL de solução salina/g de peso (Figura 3- A e B). A cada nova amostra, a tesoura, a haste e o tubo do homogeneizador de tecidos e o material cirúrgico foram limpos com solução salina, seguida de solução de hipoclorito a 2%, álcool 70% e solução salina esterilizada.

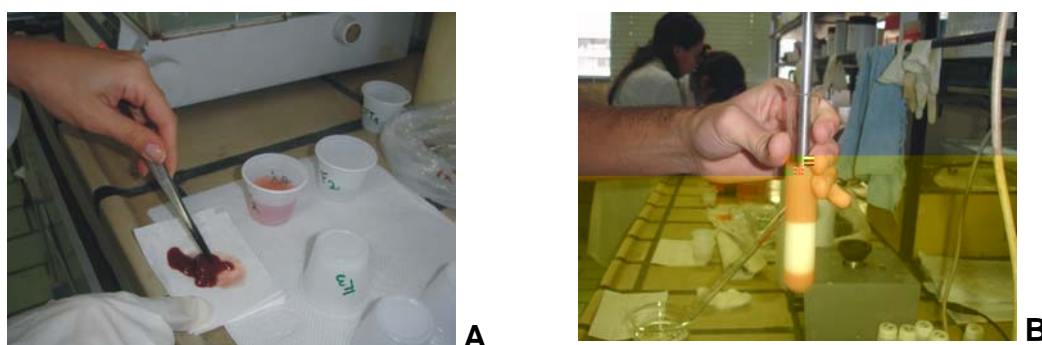


Figura 3- A) Pesagem e B) homogeneização das amostras de rim e fígado. Santa Maria, RS, 2006.

2.5- Avaliação das amostras

O material devidamente homogeneizado foi colocado em frascos de plástico esterilizado e mantido sob refrigeração em gelo. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia e cada amostra foi submetida a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em solução salina esterilizada e plaqueada em meio de cultura BDA, em triplicatas para cada diluição. As amostras plaqueadas foram incubadas a 28°C por sete dias. O número de unidades formadoras de colônias de *Trichoderma* e outros fungos foi obtido através da média do número de colônias encontradas nas três placas, fornecendo o valor de UFC/mL da suspensão de conídios (CARTER, 1993). De cada amostra de órgão e sangue homogeneizados foi retirada uma alíquota de 1 mL para análise em Câmara de Neubauer para verificação da presença dos conídios de *Trichoderma* sp., bem como, para contagem de esporos/mL de suspensão.

Paralelamente, foram confeccionadas lâminas para detecção de esporos do fungo nas amostras de sangue, rins e fígado. As lâminas contendo o esfregaço das amostras de sangue foram coradas com o corante Panótico (Laborclin®), indicado para coloração de células sanguíneas. Lâminas-padrão foram confeccionadas e serviram como referência para a visualização das células sanguíneas, dos tecidos e dos esporos do fungo (Figura 4- A e B).

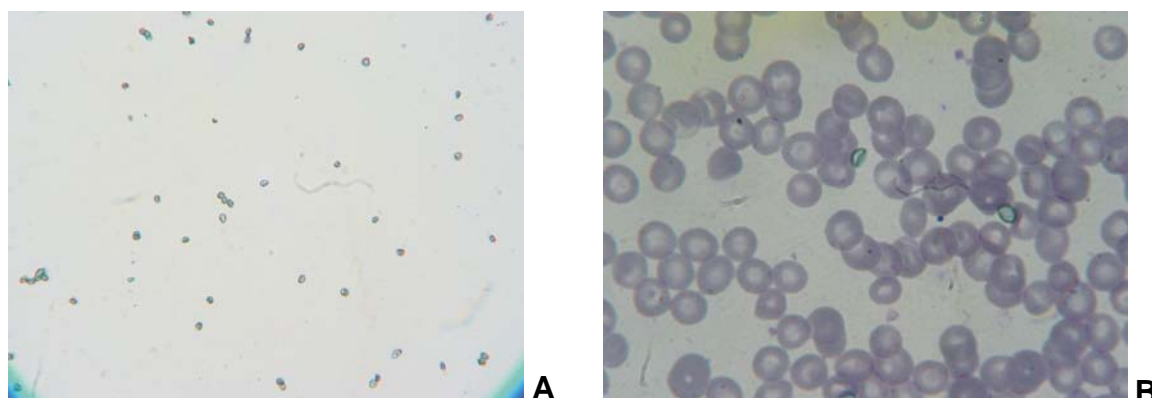


Figura 4- A) Conídios (esporos) de *Trichoderma* sp. corados com corante Panótico (Aumento 100X). B) Células sanguíneas (roxas e maiores) e conídios de *Trichoderma* sp. (azul) corados com corante Panótico (Aumento 400X).

Nas lâminas com rins e fígado, realizou-se o tratamento das amostras com KOH a 10 e 30%, indicados para detecção de hifas de fungos causadores de micoses. Na lâmina, cada amostra recebeu uma gota de KOH e foi aquecida por 15 segundos em chama de lamparina para fixação do material e degradação dos tecidos dos rins e fígado.

2.6- Análise estatística

Os dados referentes ao número de UFC foram submetidos à análise da variância com transformação das observações segundo Raiz ($X + 100$). Para comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa estatístico SANEST (ZONTA, 1984).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Avaliação dos animais e das amostras plaqueadas em BDA

Os animais não apresentaram alterações clínicas durante o experimento, nem a necropsia detectou alterações visíveis no corpo do animal.

Em relação ao número de UFC/mL de *Trichoderma* sp. e outros gêneros fúngicos, na análise de variância não se observou diferença significativa entre os tratamentos tanto no rim, no fígado e no sangue (Tabela 2).

Tabela 2- Número de UFC/mL de *Trichoderma* sp. e outros gêneros fúngicos encontradas nos tecidos de ratos tratados com o biopreparado desse fungo. Santa Maria, RS, 2006.

Tratamentos	Nº de UFC/mL (x10 ³)					
	RIM		FÍGADO		SANGUE	
	Trichod.*	Outros fungos	Trichod.	Outros fungos	Trichod.	Outros fungos
Biopreparado ativo	0,0 a**	3,1 a	0,0 a	7,7 a	0,0 a	8,5 a
Biopreparado inativado	0,0 a	5,1 a	0,0 a	2,7 a	0,5 a	7,5 a
Controle (CT)	0,0 a	3,4 a	0,0 a	4,2 a	0,6 a	4,9 a
C.V. %	4,3	22,9	4,3	24,5	4,7	26,6

* Trichod. = *Trichoderma* sp. ** Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Em relação ao número de UFC/mL de *Trichoderma* sp., tanto nas amostras de rim como de fígado, não foram detectadas colônias desse fungo. Já nas amostras de sangue, o tratamento controle apresentou maior número de colônias, seguido dos tratamentos com fungo inativado e ativo. Tal fato sugere a possibilidade de contaminação dessas amostras, uma vez que nas amostras dos ratos tratados com fungo ativo (AT) não se detectaram UFC de *Trichoderma* sp.

Quanto aos outros gêneros fúngicos, tanto nas amostras de rim, fígado e sangue foram observados fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Fusarium*. Apesar de não haver diferença significativa, em relação ao número de UFC para fungos em geral, as amostras de sangue também apresentaram maior média, seguidas das amostras de fígado e rim, respectivamente.

Em um plaqueamento complementar (em BDA) da ração oferecida aos ratos e também da palha colocada nas gaiolas, observou-se a ocorrência de alguns gêneros fúngicos, como: *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Esses dados, assim como das amostras de rim, fígado e sangue, sugerem a possibilidade da sobrevivência desses fungos dentro do corpo do animal, e de formas de

translocação entre os diversos tecidos animais. Castro et al. (2001) enfatizam a necessidade de mais estudos uma vez que tal fato envolveria capacidade dos conídios atravessarem membranas biológicas e assim entrariam na corrente sanguínea.

3.2- Avaliação das lâminas

De todas as amostras que foram plaqueadas em BDA também foram confeccionadas lâminas para a detecção de esporos e/ou hifas de *Trichoderma* sp. em Câmara de Neubauer e através de coloração e digestão das amostras. Porém, em nenhuma lâmina detectaram-se estruturas desse fungo.

De acordo com os resultados obtidos, acredita-se que são necessários estudos mais detalhados para aferir a segurança do uso de *Trichoderma* sp. no biocontrole de doenças. Além disso, fazem-se necessárias metodologias voltadas à detecção de esporos e/ou propágulos de fungos em amostras de tecidos e órgãos animais.

4- CONCLUSÕES

- A administração do biopreparado de *Trichoderma* sp. (UFSMT17) em ratos não tem efeitos adversos.
- Nos ratos tratados com o biopreparado de *Trichoderma* sp., não foram encontrados conídios viáveis do fungo nos tecidos amostrados.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAVO, E.; HEDGER, J. **Microflora associated “witches broom” in cocoa and its potential role in the biological control of the pathogen *Crinipellis pernicios***. In: International Cocoa Conference, 10, Santo Domingo, República Dominicana. *Proceedings*. Santo Domingo: Cocoa Producers' Alliance, p.345-353. 1988.

BRAZNER; J.C.; ANDERSON, R.L. Ingestion and absorption of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by *Gammarus lacustris* in the laboratory. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1386-1390. 1986.

CAPALBO, D. M. F.; NARDO, E. A. B. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico. Cap. 11. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. v. 2. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 2000. 388 p.

CARTER, M. R. (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

CASTRO, V. L.; JONSSON, C. M. Avaliação de risco ecotoxicológico de biopesticidas - mamíferos e organismos aquáticos. Cap. 10. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. v. 3. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 2000. 388 p.

CASTRO, V.; CAPALBO, D.; MORAES, G.; NARDO, E.; OLIVEIRA, M. et al. **Protocolos de avaliação de agentes microbianos de pragas para registro como biopesticidas** - Testes toxicopatológicos em mamíferos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente (Embrapa Meio Ambiente, Documentos, 10), v. 2. 1999.

CASTRO, V. S. S.; JOSSON, C. M.; MELO, I. S.; NUNES, F. V. et al. Avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**: 4(1), p. 18-24. 2001.

CHET, I. *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I., (Ed.) **Innovative approaches to plant disease control**. New York: John Wiley & Sons, 1987.

GENTHNER, F.J.; MIDDAUGH, D.P.; FOSS, S.S. Validation of embryo test for determining effects of fungal pest control agents on nontarget aquatic animals. **Archives of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 29, p. 540-544. 1995.

GENTHNER, F.J.; MIDDAUGH, D.P. Nontarget testing of an insect control fungus effects of *Metarhizium anisopliae* on developing embryos of the inland silverside fish *Menidia beryllina*, **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 22, p. 163-171. 1995.

JONSSON, C.M.; GENTHNER, F.J. **Avaliação do potencial de patogenicidade e toxicidade do fungo entomopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia* em duas espécies de crustáceos**. Embrapa-CNPMA, Boletim de Pesquisa, 1997. 127 p.

JONSSON, C. M.; MAIA, A. H. N. **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle biológico de pragas para registro como biopesticidas** - Testes em organismos não alvo do ambiente aquático. Embrapa Meio Ambiente (Série Documentos), v. 3, 1999. 33p.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295. 1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. Cap. 1. In: Melo, I. S. de., Azevedo, J. L. **Controle biológico**. v. 1. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

PESTICIDE. Assessment Guidelines – Subdivision M. Microbial Pest Control Agents and Biochemical Pest Control Agents, Washington: U.S. **Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances**, 1989. 192 p.

URI, N.D. The implications of US Government policy on the development and use of biopesticides. **International Journal of Environment and Pollution**. v. 11, p. 117-132. 1999.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. D.; SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores: SANEST**. Pelotas: UFPEL, 1984. (Registro SEI nº 06606-0 categoria AO).

ANEXO 2

Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g de dextrose;
- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada
- 1 mL de estreptomicina / 100 mL de meio de cultura

DHINGRA, O. D. & SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. Boca Raton : CRC Press, 1995. 434 p.

ANEXO 3

Meio de cultura seletivo para *Trichoderma*

- 3 g de glicose;
- 0,15 g de KCl;
- 15 g de ágar;
- 0,9 g de KH_2PO_4 ;
- 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 g de NH_4NO_3 ;
- 1 L de água destilada
- 1 mL de estreptomicina / 100 mL de meio de cultura

DHINGRA, O. D. & SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. Boca Raton : CRC Press, 1995. 434 p.

ANEXO 4

Meio de cultura Nash-Snyder (NS)

- 15 g de peptona;
- 20 g de ágar;
- 1 g de KH_2PO_4 ;
- 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 g de pentacloronitrobenzeno (PCNB 75%);
- 1 L de água destilada
- 1 mL de estreptomicina / 100 mL de meio de cultura

NASH, S. M. & SNYDER, W. C. Nash & Snyder Medium. **Phytopathology**, v. 52, p. 567-572. 1962.

ANEXO 5

Meio de cultura Folha-de Cravo (FCA ou CLA)

- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- folhas de cravo

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium species: an illustrated manual for identification***. Philadelphia : Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

ANEXO 6

Meio de cultura Batata-Dextrose (BD)

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g de dextrose;
- 1 L de água destilada
- 1 mL de estreptomicina / 100 mL de meio de cultura

DHINGRA, O. D. & SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. Boca Raton : CRC Press, 1995. 434 p.

APÊNDICE A

Análise de solo realizada pelo Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Solos / CCR / UFSM

Nº	Identificação da amostra	% MO m/V
1	Solos sem sintoma da doença	2,4
2	Solos com sintoma da doença	2,6
3	Solos antes da esterilização	2,1
4	Solos após esterilização	2,3

Nº	Textura	%argila m/V	pH:H ₂ O 1:1	Índice SMP
1	4	17	5,7	6,6
2	4	20	6,1	6,3
3	4	20	5,6	6,5
4	4	18	6,4	6,8

Nº	Al	Ca	Mg	H+Al	CTC Efetiva	Al	Bases %
	cmol _c /dm ³	cmol _c /dm ³	cmol _c /dm ³	cmol _c /dm ³			
1	0	12,5	4,2	2,2	17,4	0	89
2	0	11,4	3,9	3,1	15,9	0	84
3	0	10,6	4	2,5	15,4	0	86
4	0	12,9	4,2	1,7	17,8	0	91

Nº	Relações					
	Fe mg/dm ³	Mn mg/dm ³	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	(Ca+Mg)/K
1	78,4	17,9	3	17,2	5,8	0,178
2	68,8	19,9	2,9	19,9	6,8	0,146
3	121	24,2	2,6	13	4,9	0,214
4	44	9	3,1	17,5	5,7	0,178

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)