

Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas

Selection of fungi antagonistic to *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in commercial substrate for seedlings

Luciana Zago Ethur¹ Elena Blume^{1*} Marlove Fátima Brião Muniz¹ Maria Georgina Veiga Flores¹

- NOTA -

RESUMO

Testes in vitro são geralmente utilizados para a seleção inicial de agentes de biocontrole contra fungos de solo, faltando metodologias que utilizem solo e/ou substrato. O objetivo deste trabalho foi realizar a seleção massal de isolados fúngicos antagonísticos a *F. solani* e *F. oxysporum* em substrato comercial para mudas. Foram realizados dois experimentos com os patógenos *F. solani* e *F. oxysporum* e com 98 possíveis antagonistas fúngicos, dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*. A suspensão dos patógenos foi inserida no substrato, em copos plásticos, sendo acrescentada, cinco dias depois, a suspensão dos demais fungos. Avaliou-se o número de unidades formadoras de colônia de *F. solani* e *F. oxysporum* por grama de substrato após nove dias. Dos 98 isolados utilizados contra *F. solani*, 43 % não diferiram da testemunha e 57% reduziram o seu desenvolvimento em substrato, sendo que os três melhores isolados fúngicos foram do gênero *Trichoderma*. Os três isolados de *Trichoderma* selecionados para *F. solani* também foram eficientes para *F. oxysporum*.

Palavras-chave: biocontrole, fungos de solo, *Trichoderma* spp.

ABSTRACT

Tests in vitro are usually used for the initial selection of biocontrol agents against soil fungi, lacking methodologies using soil and/or substrate. The objective of this research was to accomplish the mass selection of fungi isolates antagonistic to *F. solani* and *F. oxysporum* in commercial substrate for seedlings. Two experiments were conducted, with the pathogens *F. solani* and *F. oxysporum*, and 98 possible antagonistic fungi of the genera *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium*. The suspension of the pathogens was inoculated

in the substrate, in plastic cups, and the suspension of the other fungi was added five days later. The number of colony-forming unit of *F. solani* and *F. oxysporum*/g of substrate was counted after nine days. Of the 98 isolates used against *F. solani*, 43% did not differ from the control, and 57% reduced its development in the substrate, with the three best isolates belonging to the genus *Trichoderma*. The three isolates of *Trichoderma* selected for *F. solani* were also efficient against *F. oxysporum*.

Key words: biocontrol, soil fungi, *Trichoderma* spp.

F. solani (Mart.) Hans e *F. oxysporum* Schlecht são fitopatógenos habitantes do solo causadores de podridões de raiz e murchas, respectivamente. Esses patógenos são importantes devido aos danos econômicos causados no setor agrícola e por sua distribuição cosmopolita (GHINI & NAKAMURA, 2001). O controle de doenças causadas por patógenos de solo é dificultado devido à complexidade do ambiente, no qual o controle químico tem sua eficiência prejudicada ou sua aplicação dificultada. Além disso, o controle químico pode causar danos na microbiota benéfica e deixar resíduos no ambiente, buscando-se no controle biológico uma alternativa mais sustentável.

Um dos pontos centrais para o biocontrole ser efetivo contra fungos de solo é o antagonista, pois as chances de sucesso nos programas de controle biológico estão no isolamento e na seleção de

¹Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: eblume@smail.ufsm.br. *Autor para correspondência.

microrganismos antagonísticos eficientes (GHINI & KIMATI, 1989). A maior parte dos trabalhos que visam à seleção de antagonistas fúngicos a fitopatógenos ocorre com testes *in vitro*, que são mais fáceis e rápidos que os efetuados com solo, permitindo que uma grande população seja avaliada (MARIANO, 1993), mas que nem sempre apresentam correlação com os resultados obtidos em condições de campo (GHINI & NAKAMURA, 2001).

Para *Trichoderma spp.*, os testes *in vitro* mais utilizados na seleção em massa de isolados antagonistas de fungos de solo são o pareamento de culturas (confronto direto) e a detecção de metabólitos voláteis e não-voláteis, todos realizados em meios de cultura à base de ágar (BELL et al., 1982; ASKEW & LAING, 1994; PATRICIO et al., 2001; ETHUR et al., 2005).

Uma alternativa à seleção *in vitro*, para a supressividade de solos contra *Fusarium*, foi proposta por TOYOTA et al. (1996) e GHINI & NAKAMURA (2001), baseando-se no desenvolvimento do patógeno sobre agregados de solo previamente colonizados por possíveis antagonistas. Entretanto, essa metodologia é trabalhosa e difícil de ser empregada em seleção massal com vários isolados de possíveis antagonistas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar seleção massal de isolados fúngicos antagonísticos a *F. solani* e *F. oxysporum* em substrato comercial para mudas, para serem utilizados em programas de controle biológico.

Nos ensaios, foram utilizados um isolado de *F. solani* e dois isolados de *F. oxysporum*, causadores de murcha no pepineiro e no tomateiro, e 98 isolados fúngicos de possíveis antagonistas, obtidos de solo não-rizosférico e rizosférico dessas olerícolas.

No primeiro experimento para a seleção de antagonistas, foram utilizados os 98 isolados dos gêneros *Trichoderma* (73 isolados), *Penicillium* (14), *Aspergillus* (7) e *Cladosporium* (4) e um isolado de *F. solani*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 99 tratamentos (98 isolados de possíveis antagonistas e testemunha apenas com *F. solani*), com quatro repetições.

O fitopatógeno foi repicado para placas de Petri contendo meio NS (Nash & Snyder - 20g de ágar, 15g de peptona, 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0g de KH_2PO_4 , 1g de quintonzene e 1L de água), as quais foram deixadas em incubadora a 24°C por 7 dias. Após isso, foram acrescentados 3mL de água destilada e esterilizada por placa, e o micélio e os esporos foram removidos com o auxílio da alça de Drigalsky, formando uma suspensão. As suspensões foram ajustadas para 106 esporos mL^{-1} .

Dois gramas de substrato (não esterilizado) foram adicionados em copos plásticos com capacidade para 50mL. Em seguida, foi inoculado 1mL da suspensão do fitopatógeno no substrato e os copos foram fechados com papel filme e papel manteiga. Os copos foram deixados em temperatura ambiente e, a cada dois dias, foi acrescentado 1mL de água destilada e esterilizada para evitar o ressecamento do substrato. Cinco dias depois da inoculação do patógeno, após ter ocorrido a colonização do substrato (constatada por testes anteriores, dados não publicados), foi acrescentado 0,5mL da suspensão dos possíveis antagonistas fúngicos (10^8 esporos mL^{-1}) retirados com o auxílio de alça de Drigalsky de placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). No tratamento testemunha, foi aplicado 0,5mL de água destilada e esterilizada. Após nove dias, os dois gramas de substrato dos copos foram acrescentados a frascos de vidro com 98mL de água destilada e esterilizada e colocados em agitador mecânico por 30 minutos. Dessa suspensão original, foram retirados 5mL e acrescentados em frasco com 95mL de água destilada e esterilizada. Dessa diluição, uma alíquota de 1mL foi espalhada em placas de Petri contendo meio NS, utilizando-se quatro repetições. Antes de o meio de cultura ser plaqueado, acrescentaram-se 5mL de cloranfenicol 10% para cada litro de meio de cultura. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 24°C, com fotoperíodo de 12h, durante sete dias. Após a incubação, o número de colônias de *Fusarium* foi contado em cada placa e calculado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) g^{-1} de substrato.

Para o segundo experimento, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 16 (15 isolados fúngicos e testemunha) x 2 (isolados de *F. oxysporum*), com 4 repetições. Foram utilizados 15 isolados fúngicos dos gêneros *Trichoderma* (9 isolados), *Penicillium* (2), *Aspergillus* (2) e *Cladosporium* (2); e dois isolados de *F. oxysporum*, que foram utilizados separadamente. Foi realizado sorteio de dois isolados fúngicos para cada gênero e, para *Trichoderma*, foram sorteados seis mais os três isolados que apresentaram melhor desempenho no experimento anterior. A metodologia foi a mesma utilizada no primeiro experimento.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e ao teste de Tukey a 5%, para comparação de médias. As médias em UFC de *F. solani* e *F. oxysporum* foram transformadas para $LOG_{10}(UFC + 1)$. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SOC (EMBRAPA, 1997).

Dos 98 isolados fúngicos utilizados como possíveis antagonistas, 42 isolados (43%) não diferiram da testemunha e os demais isolados reduziram

significativamente o desenvolvimento do patógeno, sendo que três do gênero *Trichoderma* apresentaram os melhores resultados (Tabela 1). Na análise microbiológica do substrato Plantmax®, constatou-se

a presença de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, em quantidades inferiores às inoculadas e obtidas nas avaliações dos experimentos.

Tabela 1 – Sobrevivência de *Fusarium solani* (Log_{10} UFCg⁻¹ de substrato) em substrato tratado com possíveis antagonistas fúngicos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*.

Isolado fúngico	<i>F. solani</i> – Log_{10} UFCg ⁻¹ substrato	Isolado fúngico	<i>F. solani</i> – Log_{10} UFCg ⁻¹ substrato
HS17 -1*** (P)****	10,865* a	ETSR10-2 (T)	9,416 b...m
ES18-2 (A)	10,362 ab	ETSR1-4 (T)	9,411 b...m
HS19-2 (C)	10,360 ab	ETSR11-4(T)	9,401 b...m
EPSR5-3 (A)	10,356 ab	HTSR19-5 (T)	9,364 b...n
TESTEM	10,318 abc	ETSR14-3 (T)	9,331 b...o
HS15-1 (A)	10,314 abc	EPSR7-1(T)	9,286 b...o
HS17-1 (C)	10,309 abc	HPSR3-1 (T)	9,232 b...p
HS13-3 (A)	10,302 abc	EPSR20-1(T)	9,224 b...p
HS7-2 (P)	10,301 abc	EPSR3-2 (T)	9,187 b...q
ETSR12-1 (C)	10,289 abc	EPSR13-2 (T)	9,167 b...r
HS16-2 (P)	10,286 abc	EPSR5-2 (T)	9,161 b...r
HTSR9-2 (C)	10,267 abc	EPSR9-2 (T)	9,132 b...r
HTSR15-2 (A)	10,264 abc	HPSR11-3 (T)	9,123 b...s
ETSR20-4(T)	10,264 abc	HPSR1-1 (T)	9,099 b...t
ETSR2-3 (A)	10,263 abc	HPSR6-3 (T)	9,034 c...t
ES12-2 (A)	10,246 abcd	EPSR16-1(T)	8,967 d...u
HPSR6-2 (P)	10,229 abcd	ETSR20-3 (T)	8,966 d...u
HS3-3 (T)	10,095 abcde	ETSR7-1 (T)	8,900 e...u
HTSR3-2 (P)	10,029 abcdef	ETSR4-3 (T)	8,899 e...u
ETSR12-4 (P)	10,028 abcdef	HPSR15-5 (T)	8,868 e...v
ETSR20-2 (T)	9,995 abcdefg	HS10-1 (T)	8,847 e...v
ES17-3 (P)	9,990 abcdefg	EPSR9-3 (T)	8,836 e...v
HS2-3 (T)	9,988 abcdefg	HS7-3 (T)	8,813 e...w
HTSR5-3 (P)	9,970 abcdefg	ETSR9-2 (T)	8,811 e...w
HTSR11-2 (T)	9,875 abcdefg	ETSR6-1 (T)	8,791 f...w
ETSR15-3 (P)	9,869 a...h	ETSR2-2 (T)	8,784 f...w
HPSR14-2 (P)	9,861 a...h	ES7-2 (T)	8,761 f...w
HPSR17-1 (P)	9,832 a...h	EPSR11-1 (T)	8,736 g...w
ES15-2 (T)	9,831 a...h	ETSR16-1(T)	8,595 h...x
EPSR1-3 (P)	9,793 a...i	HS8-2 (T)	8,538 i...x
ES3-1 (T)	9,751 a...i	HPSR18-3 (T)	8,536 i...x
EPSR19-2(T)	9,733 a...i	ETSR11-3 (T)	8,391 j...x
HTSR12-1 (T)	9,681 a...j	EPSR8-2 (T)	8,319 k...x
ETSR9-1 (T)	9,664 a...j	ES16-1 (T)	8,251 m...y
HTSR8-1 (T)	9,658 a...j	ETSR18-2 (T)	8,130 m...y
HTSR12-4 (P)	9,657 a...j	HS16-4 (T)	8,127 m...y
ETSR4-2 (T)	9,651 a...j	ETSR13-3 (T)	8,125 m...y
ES9-1 (P)	9,651 a...j	HPSR19-1 (T)	8,101 n...y
EPSR2-4 (T)	9,647 a...j	ETSR20-1 (T)	8,062 o...y
EPSR11-3 (T)	9,636 a...j	HPSR17-2 (T)	7,955 p...y
ETSR7-1 (T)	9,619 a...j	HS4-1 (T)	7,898 q...y
EPSR6-1(T)	9,616 a...j	EPSR6-3 (T)	7,881 r...y
ES12-1 (T)	9,583 a...k	HS1-3 (T)	7,833 s...y
ETSR3-2 (T)	9,570 b...k	EPSR19-1 (T)	7,826 t...y
ES4-2 (T)	9,538 b...l	ETSR5-1 (T)	7,732 u...y
HS20-2 (T)	9,529 b...l	ETSR1-2 (T)	7,601 vwxy
HPSR13-1(T)	9,492 b...l	ETSR8-2 (T)	7,529 vwxy
ES17-1 (T)	9,465 b...l	ETSR20-1 (T)	7,412 xy
HTSR16-2 (T)	9,451 b...l	HTSR5-1 (T)	7,010 y
HTSR4-1 (T)	9,426 b...l		

*Média da leitura de 4 placas. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

**HS17 -1 – (H) horta, (S) solo não-rizoférico (17) n° da coleta e (1) n° do isolado fúngico retirado da coleta. (E) estufa; (P) pepineiro; (T) tomateiro; (SR) solo rizoférico.

*** Gênero fúngico - (T) *Trichoderma*; (P) *Penicillium*; (A) *Aspergillus*; (C) *Cladosporium*.

... indica letras entre a primeira e a última letra.

Os isolados de *Trichoderma* foram mais efetivos na redução da população de *F. solani*, quando comparados aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*. Ao contrário de GHINI & NAKAMURA (2001), que, em experimento utilizando microcosmos e com acréscimo dos antagonistas anteriormente ao do patógeno (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder), encontraram maior redução na população do patógeno com isolados de *Penicillium* sp. do que com *Trichoderma* sp. Já TOYOTA et al. (1996), em trabalho com microcosmos, utilizando como patógeno *F. oxysporum* f. sp. *raphani* Kendrick & Snyder, encontraram maior redução da população do patógeno com isolado de *Trichoderma viride* Pers. ex Fr., seguido por *Penicillium claviforme* Bainier e por *Cladosporium herbarum* Link ex Fr.

Foram selecionados, através desse método, três isolados de *Trichoderma*, HTSR5, ETSR20 e ETSR8, com potencial antagônico a *F. solani* (Tabela 1).

Deve-se ressaltar que, uma vez que esse método não representa um patossistema completo, assim como a metodologia desenvolvida por GHINI & NAKAMURA (2001), a seleção baseia-se no efeito direto dos antagonistas na redução da população do patógeno em substrato. Segundo TOYOTA et al. (1996),

Tabela 2 – Sobrevivência de *Fusarium oxysporum* (Log₁₀ UFCg⁻¹ de substrato) em substrato tratado com possíveis antagonistas fúngicos dos gêneros *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Isolado fúngico	<i>F. oxysporum</i> - Log ₁₀ UFCg ⁻¹ de substrato
Testemunha	11,99*a
ETSR12-1** (C)***	10,52 b
ES18-2(A)	10,51 b
HTSR9-2 (C)	10,41 b
ETSR2-3 (A)	10,39 b
HS7-2 (P)	10,37 b
ETSR15-3 (P)	10,18 bc
ES17-1 (T)	10,17 bc
EPSR11-3 (T)	10,17 bc
EPSR7-1 (T)	10,15 bc
ETSR6-1 (T)	10,12 bc
ETSR16-1 (T)	9,95 bcd
EPSR6-3 (T)	9,56 cd
ETSR20-3 (T)	9,15 de
HTSR5-1 (T)	8,59 ef
ETSR8-2 (T)	8,50 f

*Média de 4 repetições. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

**ETSR12-1 (E) estufa, (T) tomateiro, (SR) solo rizosférico, 12 – número de coleta, 1 – número do isolado encontrado na coleta. (H) horta, (P) pepineiro, (S) solo não-rizosférico.

***Gênero fúngico - (T) *Trichoderma*; (P) *Penicillium*; (A) *Aspergillus*; (C) *Cladosporium*.

uma estratégia para controlar a doença é prevenir a proliferação do patógeno no solo ou diminuir sua densidade populacional.

Para o experimento com *F. oxysporum*, não ocorreu interação entre os fatores isolados fúngicos de antagonistas (gênero *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Trichoderma*) e patógenos (2 isolados de *F. oxysporum*) mas ocorreram diferenças significativas entre os isolados fúngicos de antagonistas (Tabela 2). Todos os isolados fúngicos reduziram a população dos patógenos, ocorrendo menor número de UFC do que no tratamento testemunha, demonstrando potencial antagônico aos dois isolados de *F. oxysporum*.

A redução máxima na população de *F. oxysporum* (Tabela 2), assim como de *F. solani* (Tabela 1), foi apresentada pelos isolados do gênero *Trichoderma*, sendo que as maiores médias foram as dos isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8.

REFERÊNCIAS

ASKEW, D.J.; LAING, M.D. The *in vitro* screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. *Plant and Soil*, v.159, p.277-281, 1994.

BELL, D.K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, v.72, n.4, p.379-382, 1982.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Ambiente de software NTIA, versão 3.2.2 ; manual do usuário**. Campinas: Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura, 1997. 258p.

ETHUR, L.Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, n.2, p.127-133, 2005.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagonísticos a *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1989. 13p. (Boletim de Pesquisa, 3).

GHINI, R.; NAKAMURA, D. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade de solos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em microcosmos e *in vivo*. *Summa Phytopathologica*, v.27, n.3, p.318-322, 2001.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.369-409, 1993.

PATRICIO, F.R.A. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathologica*, v.27, p.223-229, 2001.

TOYOTA, K. et al. Microbiological factors affecting the colonisation of soil aggregates by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. *Soil Biology & Biochemistry*, v.28, n.10, p.1513-1521, 1996.