

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

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO *Fusarium*
spp. E *Trichoderma* spp. EM SOLO COMPACTADO DE
AVEIA PRETA E SOJA SOB PLANTIO DIRETO**

TESE DE DOUTORADO

Paola Mendes Milanesi

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO *Fusarium* spp. E
Trichoderma spp. EM SOLO COMPACTADO DE AVEIA
PRETA E SOJA SOB PLANTIO DIRETO**

Paola Mendes Milanesi

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

Orientador: Prof^ª. PhD. Elena Blume

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Milanesi, Paola Mendes

Aspectos biológicos da interação *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto / Paola Mendes Milanesi.-2012.
131 p.; 30cm

Orientadora: Elena Blume

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2012

1. Fungos 2. Características edáficas 3. Polimorfismos
4. Patogenicidade 5. Micotoxinas I. Blume, Elena II.
Título.

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

ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO *Fusarium* spp. E
Trichoderma spp. EM SOLO COMPACTADO DE AVEIA PRETA E
SOJA SOB PLANTIO DIRETO

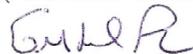
Elaborada por
Paola Mendes Milanesi

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:



Elena Blume, Ph.D.
(Presidente/Orientador)



Emerson Medeiros Del Ponte, Ph.D. (UFRGS)



Carolina Cardoso Deuner, Dra. (UPF)



Janio Morais Santurio, Ph.D. (UFSM)



Zaida Inês Antonioli, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 21 de agosto de 2012.

“O CORRER DA VIDA EMBRULHA TUDO. A VIDA É ASSIM: ESQUENTA E ESFRIA, APERTA E DAÍ
AFROUXA, SOSSEGA E DEPOIS DESINQUIETA. O QUE ELA QUER DA GENTE É CORAGEM.”
(GUIMARÃES ROSA)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação adquirida e oportunidade de realização do curso de doutorado.

Aos meus pais Moacir Moisés Milanesi e Inês Maria Mendes Milanesi: por serem presença viva em meu dia-a-dia, exemplos de caráter, dedicação e perseverança, por me auxiliarem no que for preciso tanto nas horas boas quanto nas ruins, pelo incentivo dado para que eu seguisse nos estudos, por me apoiarem e pelo auxílio financeiro nos períodos em que fiquei sem bolsa: obrigada por tudo!!

A Capes, pela concessão da bolsa de doutorado durante uma parte do curso.

À professora Elena Blume pelas muitas oportunidades concedidas para meu crescimento profissional e pessoal, pela orientação e pela confiança em meu trabalho, o meu muito obrigada!

À família Koeche, proprietária da área onde foram realizadas as coletas de solo para o trabalho, especialmente ao Sr. Volnei Koeche, por ter tornado possível a realização dessa pesquisa.

Às professoras Dra. Marlove Fátima Brião Muniz e Dra. Carolina Cardoso Deuner pela co-orientação neste trabalho e pela parceria nos trabalhos desenvolvidos.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Janio M. Santurio, Dra. Zaida Inês Antonioli, Dra. Carolina Cardoso Deuner e Dr. Emerson M. Del Ponte, pela disposição para contribuir em meu trabalho.

À laboratorista M.Sc. Maria Nevis Deconto Weber, Dra. Marina Venturini Copetti e à Dra. María Mercedes Scandiani pelos ensinamentos e incentivo dados para esta pesquisa sobre Fusarium.

Ao prof. Janio Santurio pela disponibilidade para realização de uma parte do trabalho no laboratório que coordena e também à bolsista Anelise Friedriczewski pelo auxílio na quantificação das micotoxinas.

Ao prof. José Miguel Reichert por contribuir com o trabalho através de materiais e das análises de características físicas do solo realizadas no laboratório em que é coordenador.

Aos funcionários do Depto. de Defesa Fitossanitária: Fernando, Mari, Gel e Fioravante.

Para Miria Rosa Durigon, Ricardo Feliciano dos Santos, Geísa Finger e Marciéli Pitorini Bovolini: agradeço pela amizade, apoio, troca de ideias e por todo o auxílio nas coletas de solo, instalação e avaliação de experimentos, preparo de materiais (e limpeza deles também!) e por terem feito parte dessa etapa muito importante em minha carreira acadêmica, sempre com muito boa vontade, alegria e dedicação... Valeu secretariado! Vocês são nota 10... nota 1000... são show!!!

Às amigas queridas Marília Lazarotto e Caciara Gonzatto Maciel o meu muito obrigada pela consideração, pelo carinho e apoio, trocas de ideias científicas e auxílio nos trabalhos!!

Ao Jardes Bragagnolo, agradeço o companheirismo, o carinho, a amizade, o apoio, a compreensão, o auxílio nas coletas de solo... enfim, por sempre ajudar-me a ver que vai valer à pena!!!!

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da UFSM: Clair Walker, Leise Inês, Gerarda Beatriz, Patricia Migliorini, Ricardo Mezzomo, Gisele Noal, Jucéli Müller, Cláudia Braga Dutra, Fábio André, Graziela Piveta, Bruna Bastos, Camila Pollet, Tales Poletto, Cleidionara Pacheco, Daniele Pedroso, Emanuele Junges e Johnathan Rodrigues: por tornarem o laboratório um agradável ambiente de trabalho.

A todos vocês o meu muito obrigada!!!!

RESUMO GERAL

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO *Fusarium* spp. E *Trichoderma* spp. EM SOLO COMPACTADO DE AVEIA PRETA E SOJA SOB PLANTIO DIRETO

AUTORA: PAOLA MENDES MILANESI

ORIENTADORA: ELENA BLUME

LOCAL E DATA DA DEFESA: SANTA MARIA, 21 DE AGOSTO DE 2012.

Fusarium spp. é o agente causal de podridões radiculares em diversas culturas. No sistema plantio direto, áreas compactadas favorecem a incidência dessas doenças. Esses fungos podem também infectar os grãos e produzir micotoxinas. *Trichoderma* spp. vem apresentando resultados promissores e pode ser utilizado no manejo integrado de doenças provocadas por patógenos de solo. Os objetivos deste trabalho foram: quantificar e correlacionar populações de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias) em um solo com características físicas indicativas de compactação, nos cultivos de aveia preta e soja; identificar morfológica e molecularmente os isolados de *Fusarium* spp.; caracterizar geneticamente isolados de *Trichoderma* spp.; testar a eficiência de controle *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. versus *Fusarium* spp.; e quantificar a produção de deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) pelos isolados de *Fusarium* spp. Amostras de solo foram coletadas no município de Victor Graeff (RS) em uma área previamente mapeada quanto à compactação do solo. As coletas foram feitas em três profundidades (0-5; 5-10 e 10-15 cm) e em seis níveis de compactação estabelecidos pelas medidas de resistência à penetração (Rp) (pontos com maior Rp: 3,4; 4,6 e 5,0 MPa; e menor Rp: 0,3; 1,3 e 2,2 MPa). Nas amostras coletadas foram realizadas avaliações de população fúngica e microbiana (diluições seriadas) e de características físicas do solo. Fungos dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma*, quando presentes nas diluições seriadas, foram isolados para posterior identificação morfológica e molecular (baseada nas regiões TEF-1 α e ITS, respectivamente). Foram realizados testes *in vitro* (confrontação direta) e *in vivo* (em aveia preta e soja) para avaliar a eficiência de controle de *Trichoderma* spp. versus *Fusarium* spp. A produção de DON e ZEA foi verificada pelo método Elisa e colunas de imunoafinidade, respectivamente. Em aveia preta cultivada após a soja, as características físicas e populacionais do solo se correlacionaram mais pronunciadamente, sendo que maiores populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foram encontradas nas profundidades 5-10 e 10-15 cm, respectivamente. Identificaram-se 13 espécies de *Fusarium* e a região TEF-1 α foi eficiente para sua distinção. *T. koningiopsis*, *T. tomentosum* e *T. asperellum* foram identificados, totalizando cinco isolados e todos eles apresentaram bom potencial de controle de *Fusarium* spp. em soja. Em aveia preta, destacaram-se como promotores de crescimento radicular, incrementando o peso fresco de plântulas. Em soja, isolados de *F. oxysporum* e *F. proliferatum* foram patogênicos e provocaram tombamento de plântulas. Para aveia, os isolados de *F. graminearum* não proporcionaram a observação desse sintoma. *F. graminearum* e *F. solani* produziram tanto DON quanto ZEA, enquanto que *F. proliferatum* e *F. oxysporum* produziram apenas ZEA.

Palavras-chave: Fungos. Características edáficas. Polimorfismos. Patogenicidade. Micotoxinas.

ABSTRACT GENERAL

Doctoral Thesis
Graduate Program in Agronomy
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

BIOLOGICAL ASPECTS OF INTERACTION *Fusarium* spp. AND *Trichoderma* spp. IN SOIL COMPACTED OF OAT AND SOYBEAN UNDER NO TILLAGE

AUTHOR: PAOLA MENDES MILANESI

ADVISER: ELENA BLUME

LOCATION AND DATE OF PRESENTATION: SANTA MARIA, AUGUST 21, 2012.

Fusarium spp. is the causal agent of root rot in several crops. In no tillage system, compacted areas favor the incidence of these diseases. These fungi can also infect the grains and produce mycotoxins. *Trichoderma* spp. has shown promising results and can be used in the integrated management of diseases caused by soilborne pathogens. The aims of this study was to quantify and correlate populations of *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. and others (fungi and bacteria) with physical characteristics indicative of soil compaction in the crops of oat and soybean; identify morphological and molecularly isolates of *Fusarium* spp.; genetically characterize isolates of *Trichoderma* spp.; assess the efficiency of *in vitro* and *in vivo* control of *Trichoderma* spp. versus *Fusarium* spp. ; and quantify the production of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) by *Fusarium* spp. Soil samples were collected at Victor Graeff (RS) in an area previously mapped regarding to soil compaction. The samples were taken at three depths (0-5, 5-10, and 10-15 cm) and in six compaction levels established by the measures of resistance to penetration (Rp) (points with higher Rp: 3.4, 4.6, and 5.0 MPa, and lower Rp: 0.3, 1.3, and 2.2 MPa). The samples were evaluated for fungal and microbial population (serial dilutions) and soil physical characteristics. Fungi of the genus *Fusarium* and *Trichoderma*, when present in serial dilutions, were isolated for further molecular and morphological identification (based on TEF-1 α and ITS regions, respectively). Tests were performed *in vitro* (direct confrontation) and *in vivo* (in oat and soybean) to evaluate the control efficiency of *Trichoderma* spp. versus *Fusarium* spp. The production of DON and ZEA was measured by Elisa and immunoaffinity columns, respectively. In oat grown after soybean the population and physical characteristics of the soil were showed higher correlation, with the largest populations of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. found in depths of 5-10 and 10-15 cm, respectively. 13 species of *Fusarium* were identified and the TEF-1 α region was efficient for the distinction among them. *T. koningiopsis*, *T. tomentosum* and *T. asperellum* were identified, totaling five isolates and all of them showed good potential for controlling *Fusarium* spp. in soybean. In oat, stood out as root growth promoters, increasing the fresh weight of seedlings. In soybean isolates of *F. oxysporum* and *F. proliferatum* were pathogenic and caused damping off of seedlings. For oat, the isolates of *F. graminearum* did not provide the observation of such symptoms. *F. graminearum* and *F. solani* produced both DON and ZEA, while *F. proliferatum* and *F. oxysporum* produced ZEA.

Keywords: Fungi. Soil characteristics. Polymorphisms. Pathogenicity. Mycotoxins.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Histórico de culturas implantadas na área onde foram realizadas as coletas de solo para quantificação de população fúngica e caracterização física do solo. Victor Graeff, RS, 2010.....	43
Tabela 2 - Tratamentos aplicados no teste de biocontrole <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em soja e aveia preta utilizando isolados de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. Santa Maria, RS, 2011.....	49
Tabela 3 - Informações do <i>GenBank</i> para os isolados de <i>Fusarium</i> spp. (região TEF-1 α) e <i>Trichoderma</i> spp. (região ITS) utilizados neste estudo. Santa Maria, 2012.	57
Tabela 4 - Correlações entre propriedades físicas do solo e populações (Unidades Formadoras de Colônias – UFCs) totais, de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. após cultivo de soja (sob sistema plantio direto) em área com diferentes níveis de resistência à penetração e diferentes profundidades, na safra 2009. Santa Maria, RS, 2010.	65
Tabela 5 - Correlações entre propriedades físicas do solo e populações (Unidades Formadoras de Colônias – UFCs) totais, de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. em cultivo de aveia preta (45 dias de idade) após soja (sob sistema plantio direto), em área com diferentes níveis de resistência à penetração e diferentes profundidades, na safra 2010. Santa Maria, RS, 2010... ..	67
Tabela 6 - Correlações entre as populações (Unidades Formadoras de Colônias – UFCs) totais, de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. em cultivo de aveia preta (30 dias após aplicação do herbicida glifosato), em área com diferentes níveis de resistência à penetração e diferentes profundidades, na safra 2010. Santa Maria, RS, 2010.	69
Tabela 7 - Isolados de <i>Fusarium</i> spp. de amostras provenientes de três profundidades no perfil do solo em áreas com diferentes níveis de compactação. Santa Maria, RS, 2010.	72
Tabela 8 - Crescimento micelial de isolados de <i>Fusarium</i> spp. após sete dias em teste de confrontação direta com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme escala de Bell et al. (1982) após 13 dias de incubação. Santa Maria, RS, 2010.	81
Tabela 9 - Tombamento (%) de plântulas de soja, cultivar FT-Estrela, após 30 dias de cultivo em substrato infestado com isolados de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp., de forma isolada ou combinada. Santa Maria, RS, 2011.	86
Tabela 10 - Crescimento micelial de isolados de <i>Fusarium graminearum</i> após sete dias em teste de confrontação direta com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme escala de Bell et al. (1982) após 13 dias de incubação. Santa Maria, RS, 2012.	88
Tabela 11 - Quantidades de zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) obtidas a partir de isolados de <i>Fusarium</i> spp. oriundos de solo cultivado com soja/aveia preta sob sistema plantio direto. Santa Maria, RS, 2012.	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa de resistência à penetração com diferentes níveis de compactação do solo, conforme penetrometria, em área localizada no município de Victor Graeff, RS. Santa Maria, 2008. Fonte: Girardello (2009). 44
- Figura 2 - Imagem de satélite contendo os pontos de coleta de solo, indicados por coordenadas GPS. Victor Graeff, 2012. Fonte: Google Earth (data da imagem: 11/02/2012). 45
- Figura 3 - Representação esquemática do teste de confrontação direta. a) *Trichoderma* sp. colocado na placa de Petri contendo meio de cultura BDA, 72 h após *Fusarium* sp.; b) mesma placa após sete dias de incubação (25 °C e fotoperíodo de 12 h). Fotos: Milanese (2007) – Arquivo pessoal. 50
- Figura 4 - Representação esquemática das notas da escala de Bell et al. (1982). Fotos: Milanese (2007) – Arquivo pessoal. 50
- Figura 5 - Teste de biocontrole in vivo em soja e aveia preta. a-b) isolado de *Fusarium* sp. cultivado em grãos de milho esterilizado; c) suspensão confeccionada a partir dos grãos colonizados; d) substrato agrícola (na quantidade necessária para um tratamento) previamente umedecido (500 mL de água destilada esterilizada) após a adição de 240 mL (10 mL x 24 copos) de suspensão de *Fusarium*; e) identificação do tratamento (os copos contendo os tratamentos testemunha – sem *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp., e somente *Trichoderma* sp., foram os primeiros a serem preenchidos) e f) todos os tratamentos em câmara úmida (25 °C e fotoperíodo de 12h). Santa Maria, RS, 2011. 52
- Figura 6 - População de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias) após a colheita de soja (safra 2009), nas camadas de 00-05 cm (A); 05-10 cm (B); e 10-15 cm (C), para diferentes níveis de resistência à penetração (MPa) em um Latossolo vermelho. Santa Maria, 2011. (*) Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam o desvio padrão. 60
- Figura 7 - População de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias) 45 dias após o plantio de aveia (safra 2010), nas camadas de 00-05 cm (A); 05-10 cm (B); e 10-15 cm (C), para diferentes níveis de resistência à penetração (MPa) em um Latossolo vermelho. Santa Maria, 2011. (*) Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam o desvio padrão. 62
- Figura 8 - População de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias) 30 dias após dessecação de aveia (safra 2010), nas camadas de 00-05 cm (A); 05-10 cm (B); e 10-15 cm (C), para diferentes níveis de resistência à penetração (MPa) em um Latossolo vermelho. Santa Maria, 2011. (*) Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam o desvio padrão. 63
- Figura 9 - Isolados de *Fusarium* spp. (face superior) identificados através de características morfológicas e marcadores moleculares. F1s (*F. oxysporum*); F2s (*F. proliferatum*); F3s (*F. oxysporum*); F4s (*F. oxysporum*); F5s (*F. proliferatum*); F6s (*F. avenaceum*); F7s (*F. avenaceum*); F8s (*F. solani*); F9s (*F. graminearum*); F10s (*F. graminearum*); F11s (*F. graminearum*); F12s (*F. oxysporum*); e F13s (*F. proliferatum*). Santa Maria, 2011. 73
- Figura 10 - Isolados de *Fusarium* spp. (face inferior) identificados através de características morfológicas e marcadores moleculares. F1s (*F. oxysporum*); F2s (*F. proliferatum*); F3s (*F. oxysporum*); F4s (*F. oxysporum*); F5s (*F. proliferatum*); F6s (*F. avenaceum*); F7s (*F.*

avenaceum); F8s (*F. solani*); F9s (*F. graminearum*); F10s (*F. graminearum*); F11s (*F. graminearum*); F12s (*F. oxysporum*); e F13s (*F. proliferatum*). Santa Maria, 2011. 74

Figura 11 - Dendograma baseado no método “*Neighbor-joining*” derivado das sequências da região TEF-1 α , com base em 5000 réplicas de “*bootstrap*”, dos isolados de *Fusarium* spp.: F1s, F3s, F4s e F12s: *F. oxysporum*; F2s, F5s e F13s: *F. proliferatum*; F6s e F7s: *F. avenaceum*; F8s: *F. solani*; F9s, F10s e F11s: *F. graminearum*, e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Fusarium* spp. O número nas ramificações representa o valor de “*bootstrap*”. *Neonectria radicola* (JF268757) foi utilizado como *outgroup*. Santa Maria, 2012..... 76

Figura 12 - Dendograma baseado no método de Máxima Verossimilhança derivado das sequências das regiões ITSrDNA 1 e 4, com base em 5000 réplicas de “*bootstrap*”, de isolados de *Trichoderma* spp.: T1s e T3s: *T. koningiopsis*; T2s e T4s: *T. tomentosum*; e T5s: *T. asperellum*, e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. O número nas ramificações representa o número de “*bootstrap*”. *Bionectria ochroleuca* (JN387732) foi utilizado como *outgroup*. Santa Maria, 2012..... 78

Figura 13 - Isolados de *Trichoderma* spp. identificados através de marcadores moleculares ITS. T1s e T3s: *T. koningiopsis*; T2s e T4s: *T. tomentosum*; e T5s: *T. asperellum*. Santa Maria, 2011..... 79

Figura 14 - Crescimento micelial de isolados de *Fusarium* spp. utilizados no experimento de biocontrole em soja, após sete dias, em cultivo individual e em teste de confrontação direta com isolados de *Trichoderma* spp. Santa Maria, RS, 2011. F1s, F3s e F4s (*F. oxysporum*); F2s (*F. proliferatum*); T1s e T3s (*T. koningiopsis*); T2s e T4s (*T. tomentosum*); e T5s (*T. asperellum*). *Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o desvio padrão..... 83

Figura 15 - Aspecto do substrato infestado com isolados de *Fusarium* sp., após 12 dias, e soja germinando após três dias de semeadura. a) Tratamentos contendo apenas *Fusarium* sp. e micélio do fungo cobrindo o substrato; b, c e d) detalhe do substrato infestado por *Fusarium* sp; e) sintoma de *damping off* em plântulas de soja; f) evolução do sintoma de *damping off* com morte de plântulas; e g) clorose e necrose nas bordas dos folíolos de uma plântula no início da manifestação de *damping off* em comparação com a Testemunha. Santa Maria, RS, 2011..... 84

Figura 16 - Comprimento de raiz (cm), peso fresco (g) e peso seco (g) de plântulas de soja, cultivar FT-Estrela, aos 30 dias após semeadura (DAS) em substrato infestado com isolados de *Fusarium* sp. e *Trichoderma* spp. de forma isolada ou combinada. Isolados de *Fusarium* spp.: F1s: *F. oxysporum*; F2s: *F. proliferatum*; F3s: *F. oxysporum*; F4s: *F. oxysporum*. Isolados de *Trichoderma* spp.: T1s: *T. koningiopsis*; T2s: *T. tomentosum*; T3s: *T. koningiopsis*; T4s: *T. tomentosum*; T5s: *T. asperellum*. Santa Maria, RS, 2011.*Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o desvio padrão. 85

Figura 17 – Comprimento de raiz (cm) e peso fresco (g) de plântulas de aveia preta, cultivar Comum, aos 30 dias após semeadura (DAS) em substrato infestado com isolados de *Fusarium graminearum* e *Trichoderma* spp. de forma isolada ou combinada. Isolados de *F. graminearum*: F10s e F11s. Isolados de *Trichoderma* spp.: T1s: *T. koningiopsis*; T2s: *T. tomentosum*; T3s: *T. koningiopsis*; T4s: *T. tomentosum*; T5s: *T. asperellum*. Santa Maria, RS, 2011. *Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o desvio padrão. 90

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)	123
Anexo 2 - Meio de cultura Ágar-Ágar (AA)	124
Anexo 3 - Meio de cultura Sintético - Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA).....	125
Anexo 4 - Meio de cultura Folha de Cravo-Ágar (FCA ou CLA).....	126
Anexo 5 - Meio de cultura Nash & Snyder (NS).....	127
Anexo 6 - Limites máximos tolerados para micotoxinas no Brasil. Adaptado de MAPA (2011)	128

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 - Análise química de solo realizada pelo Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Solos/CCR/UFSM	131
--	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Hipóteses	24
1.2 Objetivos	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 As culturas de soja e aveia preta, o sistema plantio direto (SPD) e a compactação do solo	27
2.2 A incidência de doenças radiculares em solos compactados	29
2.3 O gênero <i>Fusarium</i> e as doenças em sistema plantio direto	30
2.4 <i>Fusarium</i> spp. e a produção de micotoxinas	33
2.5 Controle biológico de doenças provocadas por <i>Fusarium</i> spp.	36
2.6 Métodos moleculares baseados na análise de DNA para caracterização de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Área de estudo e amostragem de solo	43
3.2 Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) de <i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp. e outros (fungos e bactérias)	45
3.3 Determinações de densidade do solo, macroporosidade, microporosidade, porosidade total e análise química do solo	47
3.4 Caracterização morfológica de isolados de <i>Fusarium</i> spp.	48
3.5 Seleção <i>in vitro</i> de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com antagonismo à <i>Fusarium</i> spp. em soja e aveia preta	48
3.6 Teste <i>in vivo</i> de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. em plântulas de soja e aveia preta	51
3.7 Detecção e quantificação de zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) em isolados de <i>Fusarium</i> spp. de solo com diferentes níveis de compactação	53
3.8 Caracterização molecular dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Quantificação de <i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp. e outros (fungos e bactérias) . 59	
4.2 Correlações entre <i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., outros (fungos e bactérias) e características físicas do solo	65

4.3 Caracterização morfológica e molecular de isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	70
4.4. Caracterização molecular de <i>Trichoderma</i> spp.....	77
4.5 Seleção <i>in vitro</i> de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com antagonismo à <i>Fusarium</i> spp. em soja.....	80
4.6 Teste <i>in vivo</i> de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. em plântulas de soja	83
4.7 Seleção <i>in vitro</i> de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com antagonismo à <i>Fusarium graminearum</i> em aveia preta.....	88
4.8 Teste <i>in vivo</i> de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Fusarium graminearum</i> em plântulas de aveia preta	89
4.9 Detecção e quantificação de zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) em isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de solo com diferentes níveis de compactação.	91
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	121
APÊNDICE	129

1 INTRODUÇÃO

Doenças de plantas estão entre as principais causas da redução de produtividade em diversas culturas e constituem um problema que já é citado desde a antiguidade. Por isso, o conhecimento da relação entre a microbiota e o agroecossistema é fundamental para que métodos de manejo integrado de doenças possam ser utilizados com racionalidade. Doenças causadas por patógenos de solo vêm provocando muitas perdas e os métodos de controle existentes apresentam pouca eficiência para combatê-los.

Com a modernização das técnicas de cultivo surgiu o sistema plantio direto que visa a não mobilização do solo deixando sobre o mesmo uma camada de palha. Os benefícios trazidos por esse sistema são inúmeros, porém a intensificação da mecanização nas operações agrícolas acarretou o surgimento de áreas com problemas de compactação do solo devido ao tráfego de máquinas na lavoura, alterando suas propriedades físicas. A compactação reduz a porosidade total e a macroporosidade, afetando a aeração e trocas gasosas com a atmosfera, além da infiltração de água no perfil do solo e aumento da anaerobiose. Além disso, tem-se verificado que seus efeitos também se estendem à comunidade microbiana do solo.

Em geral, áreas com solo compactado vêm apresentando aumento na incidência e na severidade de doenças radiculares, como as provocadas pelo gênero *Fusarium*, consideradas de difícil controle. Além disso, a viabilidade de patógenos de solo é prolongada devido aos restos culturais sobre o solo, visto que, alguns desses podem sobreviver como necrotróficos. *Fusarium* é um dos gêneros mais estudados, devido aos sérios problemas econômicos ocasionados pela sua ação como fitopatógeno e ampla distribuição geográfica. Em soja, fungos do complexo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. são os agentes causais da Síndrome da Morte Súbita (SMS) ou Podridão Vermelha da Raiz (PVR), doença que compromete o rendimento da cultura. Além disso, diversas podridões radiculares atribuídas a esse patógeno têm tomado proporções importantes em áreas cultivadas com soja. A utilização da rotação de culturas com plantas de cobertura, como a aveia preta, pode auxiliar na redução do inóculo do patógeno presente no solo.

Fungos do gênero *Fusarium* possuem muitas variações quanto à características morfológicas, patogênicas e de virulência, o que torna sua taxonomia muito rica em espécies, *formae specialis*, raças e isolados. Além disso, esses fungos são produtores de micotoxinas tais como deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, ocratoxina, fumonisina e toxina T-2, que quando produzidas em grãos destinados à fabricação de rações para animais, podem causar-

lhes inúmeros malefícios. Tais toxinas são comuns em grãos, e derivados destinados à alimentação humana, tais como farinhas de trigo e milho.

Como uma alternativa possível para o controle desses fitopatógenos, em especial do gênero *Fusarium*, destacam-se micro-organismos antagonistas, que podem equilibrar as populações do patógeno no solo, promovendo o controle da doença de forma progressiva. Tal forma de manejo de doenças é conhecida como controle biológico. Nesse sentido, fungos do gênero *Trichoderma* têm sido muito estudados e já são inúmeros os relatos de sua eficiência no controle de diversas doenças veiculadas pelo solo, tais como fusarioses e mofo branco (causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary).

A utilização do controle biológico já é bastante empregada na horticultura e floricultura e sua aplicabilidade para grandes culturas está se tornando uma realidade. Entretanto, ainda é preciso buscar conhecimento sobre a dinâmica desses agentes antagonistas em solos cultivados sob sistema plantio direto e com histórico de compactação, pois a pouca aeração das camadas compactadas pode comprometer sua sobrevivência.

Portanto, este trabalho justifica-se pela importância que a soja e a aveia preta assumem no cenário agrícola brasileiro, pela expansão do sistema plantio direto e pela necessidade de estudos da relação entre populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solos com zonas compactadas. Também cabe ressaltar que há carência de estudos que contemplem a produção de micotoxinas por espécies de *Fusarium* e suas relações com solo sob diferentes níveis de compactação.

1.1 Hipóteses

I) A incidência de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. está associada às alterações físicas e microbiológicas no solo devido à compactação.

II) Há diferença na frequência de isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. oriundos de zonas compactadas e não compactadas.

III) Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de zonas mais compactadas de solo cultivado com aveia preta e soja diferem com relação à eficiência de controle de isolados de *Fusarium* spp. advindos dessas áreas.

IV) Isolados de *Fusarium* spp. presentes em solo cultivado com soja não são os mesmos encontrados em solo cultivado com aveia preta.

1.2 Objetivos

- Caracterizar as populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solos cultivados com soja e aveia preta, em áreas de sistema plantio direto com diferentes níveis de compactação do solo.
- Avaliar as relações entre *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e as características físicas do solo.
- Identificar, com base em caracteres morfológicos e moleculares os isolados de *Fusarium* spp. obtidos e a caracterizar molecularmente os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados.
- Testar o potencial de controle de isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Fusarium* spp.
- Quantificar a produção das micotoxinas zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) pelos isolados de *Fusarium* spp.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As culturas de soja e aveia preta, o sistema plantio direto (SPD) e a compactação do solo

A soja (*Glycine max* L. [Merril]) é a oleaginosa mais cultivada no mundo. No Brasil, a produção na safra 2010/2011 foi de 59,8 milhões de toneladas em uma área cultivada de, aproximadamente, 21,4 milhões de hectares com um rendimento médio de 2.794 kg/ha (IBGE, 2008). A previsão para a safra 2011/2012 está entre 72 e 73 milhões de toneladas em uma área cultivada de, aproximadamente, 25 milhões de hectares (CONAB, 2011). Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos na cultura estão as doenças que podem provocar perdas de até 100% (EMBRAPA, 2007).

A maioria das áreas cultivadas com soja no Brasil são conduzidas sob sistema plantio direto, ocupando cerca de 25,5 milhões de hectares no país (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE PLANTIO DIRETO NA PALHA, 2008), sendo o não revolvimento do solo um dos preceitos do sistema. Entre as plantas de cobertura do solo mais utilizadas no estado do Rio Grande do Sul e no Brasil pode-se citar a aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.) cuja estimativa de produção para a safra 2011/2012 foi de 338,3 mil toneladas em uma área cultivada de, aproximadamente, 152,5 mil hectares (CONAB, 2011).

A aveia preta é capaz de melhorar os atributos químicos e físicos do solo, além de proporcionar aumento no rendimento das culturas subsequentes (MACHADO et al., 1999). A soja cultivada em sucessão à aveia preta é menos afetada por patógenos como *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn e *Sclerotinia sclerotiorum*. Já o trigo, em rotação com aveia preta, apresenta menor incidência de doenças radiculares, tais como a podridão de raízes, entre elas o mal-do-pé, causado por *Gaeumannomyces graminis* f. sp. *tritici* J. Walker e a podridão comum, cujo agente causal é *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (SANTOS et al., 1990).

Para o bom desempenho do sistema plantio direto alguns cuidados devem ser tomados e, entre eles, as espécies utilizadas como plantas de cobertura do solo. Resultados mais promissores são obtidos com a diversificação dessas espécies, proporcionando não apenas equilíbrio na disponibilidade de nutrientes, mas também menor incidência de problemas fitossanitários (FIORIN, 2007). Caso esses preceitos não sejam seguidos, com o passar do

tempo, essas áreas podem apresentar restrições para o desenvolvimento das plantas, tais como a compactação do solo, devido à intensificação da mecanização. Características físicas como a resistência à penetração, densidade do solo, macroporosidade, microporosidade e porosidade total podem ser utilizadas para a verificação do estado de compactação dos solos agrícolas (GIRARDELLO et al., 2011; LIMA et al., 2010; SUZUKI et al., 2008; SUZUKI et al., 2007; BEUTLER; CENTURION, 2003). Em áreas experimentais, a avaliação da qualidade do solo pode ser feita através da investigação de suas propriedades, assim como as da planta, além da densidade, permeabilidade, porosidade, resistência à penetração, agregação e desenvolvimento radicular (SOUZA et al., 2001; VIANA, 2005).

Em lavouras sob sistema plantio direto, o tráfego de máquinas induz a estados distintos de compactação, sendo que os maiores níveis ocorrem na região dita “cabeceira” da lavoura, onde as máquinas realizam as manobras, enquanto em pontos mais ao centro da lavoura a compactação é mais reduzida (SILVA et al., 2004). As principais consequências desse processo são a redução da porosidade total e, especialmente, da macroporosidade do solo, afetando sua capacidade de aeração e demais trocas gasosas com a atmosfera, além da infiltração da água da chuva no perfil do solo (NICOLOSO et al., 2008). A compactação do solo pode ser definida como um processo dinâmico e gradual, na qual ocorre um aumento da densidade (maior massa de solo por unidade de volume) proporcional ao histórico de cargas ou pressões exercidas advindas do intenso tráfego de máquinas e implementos agrícolas e do pisoteio de animais em condições de umidade elevada. Amado et al. (2005) afirmam que a compactação do solo é uma das principais causas da degradação do solo em áreas de lavouras.

Atividades como a aplicação de inseticidas e fungicidas ou operações de colheita, não permitem ao agricultor utilizar máquinas apenas quando o solo está em condições adequadas para tanto. Por isso, além do desenvolvimento de máquinas com menor potencial para a compactação, o manejo do solo com vistas a melhorias de sua resistência à compactação constitui-se em uma das alternativas que podem ajudar a reduzir esses danos (BRAIDA et al., 2006). O não revolvimento do solo resulta em uma elevação da densidade do solo na camada superficial, de 0 a 10 cm, que, sob condições normais, não causa problemas e pode desaparecer gradativamente com o passar dos anos. Em contrapartida, o reflexo de um plantio direto mal conduzido se dá na formação de camadas compactadas em maiores profundidades, de 8 até 15 cm (SALTON et al., 1998).

2.2 A incidência de doenças radiculares em solos compactados

O solo é considerado um dos principais habitats para população de micro-organismos e dentre esses, encontram-se os fungos (PAUL; CLARK, 1989) que podem ser encontrados em populações variando de 10^4 a 10^6 organismos por grama (ALEXANDER, 1977). Tais micro-organismos participam ativamente dos processos de biodeterioração e biodegradação (ALLSOP; SEAL, 1986; EGGINS; ALLSOP, 1985), contribuindo para ciclagem de nutrientes e consequentemente, para a manutenção dos ecossistemas. Além dos fungos, outros micro-organismos do solo, tais como bactérias e actinobactérias atuam na ciclagem de carbono, nitrogênio e enxofre. Esses micro-organismos podem ter sua atividade biológica afetada por cultivos sucessivos que, além de ter impacto sobre os atributos químicos e físicos do solo, provocam redução de macroagregados que fornecem importantes microhabitats para a atividade microbiana (DICK, 1992).

Os efeitos da compactação do solo se estendem à população microbiana edáfica através da exsudação produzida pelas raízes. Bouef-Tremblay et al. (1995) revelaram que a compactação do solo estimulou a exsudação de compostos solúveis e insolúveis pelas raízes. Entretanto, esses autores diagnosticaram que existe carência de estudos que avaliem os efeitos da compactação do solo sob populações microbianas que habitam o ambiente radicular. Avaliando a população microbiana da rizosfera de milho e meloeiro cultivados sob condições de solo compactado, Ikeda et al. (1997) demonstraram que essa condição afetou as populações de micro-organismos associados à rizosfera, de maneira qualitativa, sendo que o número de bactérias fluorescentes, como *Pseudomonas*, tornou-se mais elevado quando comparado a uma condição de solo não compactado.

Como prática conservacionista do solo, se mal executado, o sistema plantio direto pode causar sérios problemas fitossanitários em cultivos de soja, feijão e trigo, principalmente quando a semeadura for realizada com elevado teor de umidade, o solo estiver compactado e não se obedecer a um esquema de rotação de culturas. Assim, algumas doenças de expressão econômica na Região Sul do Brasil têm sido favorecidas pelo sistema plantio direto, tais como o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), que afeta todas as leguminosas; as doenças causadas pelo gênero *Fusarium*, como a Podridão Vermelha da Raiz (PVR) ou Síndrome da Morte Súbita (SDS) em soja (complexo *F. solani*); *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burkh.) W.C. Snyder & H.N. Hansen e *Fusarium oxysporum* Schltdl., que ocorrem no feijoeiro e *F. graminearum* no trigo; a antracnose do feijoeiro (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. &

Magnus) Briosi & Cavara); a mancha alvo e a podridão radicular de *Corynespora* (*Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei) em soja; o tombamento e a murcha de *Sclerotium* (*Sclerotium rolfsii*) nas leguminosas em geral; o tombamento e a morte em reboleira (*Rhizoctonia solani*); a podridão parda da haste da soja (*Cadophora gregata* (Allington & D.W. Chamb.) T.C. Harr. & McNew) e a podridão da raiz e da haste da soja (*Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd.) (COSTAMILAN, 1999).

A manutenção de restos culturais na superfície do solo prolonga a viabilidade de patógenos necrotróficos e sua permanência na área, retardando a decomposição dos resíduos e mantendo, por mais tempo, a fonte nutricional (COSTAMILAN, 1999). Peritécios de *Gibberella zeae* (anamorfo: *Fusarium graminearum*) podem ser encontrados em restos culturais de espécies vegetais frequentemente utilizadas como plantas de cobertura de solo no sistema plantio direto, tais como a aveia preta (REIS, 1988).

2.3 O gênero *Fusarium* e as doenças em sistema plantio direto

Fusarium é um dos gêneros mais estudados devido aos sérios problemas econômicos ocasionados pela sua ação como fitopatógeno e ampla distribuição geográfica. Essa distribuição combinada com sua densidade populacional pode estar relacionada ao clima, ao tipo de vegetação, à microbiota, aos nutrientes e ao tipo de solo (SAREMI et al., 1999). Dessa forma, a presença de patógenos de solo é de extrema importância para a recomendação de medidas de controle adequadas ao tipo de área de cultivo. A percolação da água é um mecanismo que pode afetar a disseminação de alguns fitopatógenos ao longo do sistema radicular de forma que impedimentos no fluxo de água no perfil do solo podem levar ao aumento de concentrações de inóculo, acima da camada compactada, por patógenos hidrofílicos como *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. (GRAY; POPE, 1986).

Algumas interações entre patógenos e raízes de plantas ocorrem conforme a resposta dos micro-organismos a condições de aeração e penetração, além de estresse causado pela umidade do solo. Segundo Allmaras (1988), esses fatores estão direta ou indiretamente ligados à compactação do solo. O autor ainda menciona que maior severidade de podridão de raízes do feijoeiro, causada por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, foi observada em condições de atmosfera com deficiência de O₂ e com abundância de N₂. Avaliando a severidade da PVR em soja, em função da inoculação e irrigação, Neto et al. (2006) verificaram que sintomas

típicos da doença, tanto em raízes quanto em folhas, foram observados em parcelas experimentais conduzidas sob irrigação e com problemas de compactação do solo, em todos os anos em que o estudo foi repetido.

Algumas espécies do gênero *Fusarium* sobrevivem em restos culturais no solo, através de estruturas de resistência chamadas clamidósporos, o que dificulta o seu controle principalmente em áreas onde a soja é explorada de forma contínua (CAVALCANTI et al., 2002). Além disso, características químicas, físicas e biológicas do solo podem afetar diretamente a distribuição espacial da população de *Fusarium* spp. na lavoura.

Fusarium spp. exibe uma alta variabilidade genética em nível de espécies, tornando necessária a aplicação de ferramentas que possibilitem a diferenciação entre populações do fungo. Dentro desse gênero existem variações de características morfológicas, de patogenicidade e de virulência, o que resulta em uma classificação em seções, *formae specialis* e raças (OLIVEIRA; COSTA, 2002). De acordo com Zhang et al. (2007), membros do complexo de espécies *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., que são morfológicamente similares, possuem mais de 45 linhagens distintas.

Na soja, a PVR, causada pelo complexo *Fusarium solani*, pode ser encontrada nas áreas cultivadas em todo o mundo, tais como nos Estados Unidos (RUPE et al., 2001), Canadá (ANDERSON; TENUTA, 1998), Argentina (PLOPER, 1993), Brasil (NAKAJIMA et al., 1993; 1996), Paraguai (YORINORI, 1999), Bolívia (YORINORI, 2002) e Uruguai (PLOPER et al., 2003). Os primeiros estudos de sequências de DNA, determinaram que para *Fusarium solani* existe um complexo de espécies que compreende até 26 espécies filogeneticamente distintas, com algumas ainda não descritas e que eram chamadas de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (O'DONNELL, 2000a).

Posteriormente, em estudos morfológicos e genealógicos de *Fusarium solani*, envolvendo isolados coletados na América do Norte e na Argentina, descobriram-se duas novas espécies dentro do complexo *Fusarium solani* que seriam capazes de provocar PVR em soja. Na Argentina, *Fusarium tucumanae* T. Aoki, O'Donnell, Yosh. Homma & Lattanzi e nos Estados Unidos, *Fusarium virguliforme* O'Donnell & T. Aoki (AOKI et al., 2003). Recentemente, mais duas espécies foram descritas como agentes causais da doença no Brasil, sendo elas *Fusarium brasiliense* T. Aoki & O'Donnell e *Fusarium cuneirostrum* O'Donnell & T. Aoki (AOKI et al., 2005) e, recentemente, *Fusarium crassistipitatum* sp. nov. foi identificado como causador da doença na Argentina e no Brasil (AOKI et al., 2011).

A PVR pode provocar significativa redução no rendimento e, particularmente, no número de vagens por planta (FREITAS et al., 2003). A disseminação do patógeno pode se dar através da água de irrigação e uso de implementos agrícolas que contenham propágulos de solo contaminado pelo fitopatógeno (DAVIS et al., 2006). Conforme Balardin et al. (2005), a velocidade com que o patógeno se disseminou entre as regiões produtoras no Brasil e no mundo, sugere que a semente pode ser um agente de disseminação do complexo *Fusarium solani*. Além disso, materiais inertes associados à massa de sementes também podem transportar o inóculo e disseminar eficientemente o patógeno causador da PVR.

A severidade de sintomas foliares da PVR pode ser predita pela densidade populacional do patógeno no solo, fatores esses que estão positivamente correlacionados (SCHERM et al., 1996). Além disso, a expressão dos sintomas na planta depende de fatores como ano e época de semeadura, estando relacionados com a colonização das raízes pelo patógeno (HERSHMAN et al., 1990).

Outra espécie que possui grande importância é *Fusarium graminearum* que pode ser encontrado em restos culturais e em sementes como aveia preta, trigo, cevada, arroz, milho, centeio, entre outras poáceas (REIS, 1990; SHURTLEFF, 1992). De acordo com Baird et al. (1997), culturas desse patógeno foram recuperadas a partir de restos culturais de soja, o que pode significar maior intensidade de doenças em culturas subsequentes (tais como trigo) e menor rendimento em sistema plantio direto. *Fusarium graminearum* pode ser disseminado para a parte aérea da planta através de respingos de chuva ou irrigação por aspersão (GALVES, 1976). Em milho, *Gibberella zeae* (anamorfo: *F. graminearum*) é o agente causal da podridão do colmo, doença que ataca plântulas. O fungo sobrevive nos restos culturais e produzindo estruturas denominados peritécios. Os esporos que saem dos peritécios servirão como fonte de inóculo inicial para infectar a parte aérea dos cultivos da safra seguinte, tais como aveia preta, trigo, cevada e centeio (JACKSON et al., 2009).

Possivelmente, *Fusarium graminearum* é um dos patógenos que apresentam melhor adaptação dentro desse sistema de cultivo (YUYAMA; HENNING, 1999). Recentemente, esse fungo foi encontrado associado a sementes de soja, causando redução de vigor e *damping off* (ELLIS et al., 2011). Além disso, em plantas de soja infectadas por *Fusarium graminearum* foram observados sintomas, no estágio fenológico R5 (FEHR; CAVINESS, 1977), como descoloração interna e externa da haste, além de queima da vagem e sintomas foliares (clorose internerval) (PIOLI et al., 2004).

Na Europa, os principais agentes causais de giberela em trigo são *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium culmorum* (Wm. G. Smith) Sacc., *Fusarium avenaceum*

(Fr.:Fr.) Sacc. e *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. (LANDSCHOOT et al., 2011). Testes de patogenicidade apontaram *Fusarium graminearum* como a mais agressiva em trigo dentre as encontradas na Hungria (MESTERHAZY, 1985).

Fusarium culmorum é comumente encontrado em cereais (BAKAN et al., 2002) e, assim como *Fusarium graminearum*, é produtor de tricotecenos tipo B (deoxinivalenol e acetildeoxinivalenol) (MARASAS et al., 1984). Além da produção de micotoxinas, essas espécies, juntamente com *Fusarium avenaceum*, podem causar morte de plântulas, podridão de raízes e danos em espigas (no caso de cereais de inverno), resultando em perda de rendimento (PARRY et al., 1995). Na Tunísia, a inoculação de sementes de cultivares de trigo duro com *Fusarium culmorum* foi capaz de reduzir o rendimento das mesmas. Também foi observado um aumento na incidência de podridão radicular e de coroa quando as plantas inoculadas com o patógeno foram expostas a um cenário de estresse hídrico. Esse estudo concluiu que a resistência da cultivar de trigo duro e o manejo da irrigação podem ser importantes no controle de podridão radicular provocada por *Fusarium* (CHEKALI et al., 2011).

A distribuição bem como a predominância do complexo *Fusarium graminearum* está fortemente associada a fatores climáticos, especialmente a temperatura e umidade. Outro fator importante para a sobrevivência do inóculo inicial do(s) patógeno(s) causadores de giberela em cereais de inverno é o sistema de cultivo adotado (LANDSCHOOT et al., 2011). Entre algumas medidas de controle voltadas ao patossistema giberela/cereais de inverno, pode-se citar: i) aplicação de fungicidas; ii) esquema de rotação de culturas; iii) manejo de plantas invasoras (que poderiam constituir hospedeiros alternativos ao complexo *Fusarium graminearum*) e iv) resistência genética do hospedeiro (SCHAAFSMA; HOOKER, 2007). O sistema plantio direto, no qual os restos culturais permanecem na lavoura entre um cultivo e outro, certamente contribui para a manutenção do inóculo primário de *Fusarium graminearum* que iniciará um novo ciclo da doença no próximo cultivo de cereais de inverno (LANDSCHOOT et al., 2011).

2.4 *Fusarium* spp. e a produção de micotoxinas

Espécies de *Fusarium* produzem metabólitos secundários nos tecidos do hospedeiro que podem ser fatores de patogenicidade ou virulência (JOFFE, 1986). Isolados de *Fusarium*

solani f. sp. *glycines*, em meio de cultura, produzem um polipeptídeo fitotóxico, com peso molecular de 17 kDa, e uma fitotoxina de baixo peso molecular conhecida como monorden. Além desta, isolados de *Fusarium* são capazes de produzir uma gama de toxinas tais como novarubina, norjavanicina, javanicina, fusarubina, marticina e isomarticina (BAKER; NEMEC, 1994).

Conforme relatado por Souza Filho e Duarte (2007), o efeito provocado pelas toxinas produzidas por *Fusarium* spp. pode ser resultado da ação isolada de uma delas ou pela sua ação conjunta. Os autores verificaram o potencial alelopático que filtrados de cultura do patógeno apresentaram sob a germinação de sementes de malícia (*Mimosa pudica* L.) e mata-pasto (*Senna obtusifolia* (L.) Irwin; Barneby), plantas invasoras de pastagens. Filtrados de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* foram relatados como tóxicos a calos, sementes em germinação, cotilédones e plantas de soja (JIN et al., 1996). Em trigo e outros cereais de inverno, o acúmulo de micotoxinas nos grãos infectados com o fungo reduz a qualidade dos mesmos, já que pode provocar micotoxicoses aos seres humanos e aos animais. O fungo, além de infectar as espigas, pode também infectar a raiz, a coroa e partes basais da planta de trigo, causando morte de plântulas (podridão comum da raiz) (SUTTON, 1982).

Os tricotecenos formam um grupo que compreende cerca de 180 compostos produzidos por *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium* e outros gêneros fúngicos. O nome dessas toxinas é derivado do fungo *Trichothecium* e, esses compostos, estão quimicamente relacionados aos sesquiterpenóides que possuem um esqueleto tetracíclico 12,13-epoxi-tricotec-9-eno com funções ester e álcool nas porções externas da molécula (NEWMAN; RAYMOND, 2005). A presença ou ausência de grupos funcionais nessa estrutura pode classificá-los como do tipo A, B, C e D (GERALDO et al., 2006).

Tais compostos possuem vários graus de citotoxicidade e, algumas características toxicológicas da contaminação por tricotecenos em mamíferos são inibição da síntese de proteínas, irritação da pele, hemorragia, diarreia, náuseas, refluxo alimentar e vômitos (SMITH; MOSS, 1985). Deoxinivalenol, fusarenon-X, diacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol e toxina T2 são os tricotecenos mais frequentemente encontrados em *Fusarium graminearum* (GERALDO et al., 2006). O *gene cluster TRI* é responsável por codificar enzimas catalisadoras de reações bioquímicas que resultam na formação dos tricotecenos (BROWN et al., 2004). Atualmente, a contribuição do *gene cluster TRI* vem sendo elucidada através de marcadores moleculares (ALEXANDER et al., 2011).

O tricoteceno deoxinivalenol (DON) é classificado como um tricoteceno tipo B (presença de função ceto no oitavo átomo de carbono e presença de função hidroxila no

sétimo carbono) (ALEXANDER et al., 2011), e pode ocorrer tanto na forma monoacetilada (15-acetyldeoxynivalenol, 15-ADON) quanto diacetilada (3-acetyldeoxynivalenol, 3-ADON). É uma das principais micotoxinas encontrada em trigo, aveia, centeio, cevada e milho. Além de DON e suas formas acetiladas, nivalenol (NIV) é outra micotoxina classificada nesse grupo e geralmente encontrada nas culturas acima mencionadas (DEL PONTE et al., 2012; MATTILA, 2010; LOGRIECO et al., 2002).

Outra micotoxina importante que pode ser produzida por *Fusarium* é a zearalenona (ZEA). Produto do metabolismo secundário do fungo possui atividade estrogênica em mamíferos (MARASAS et al., 1984; NEISH; COHEN, 1981). Essa micotoxina ocorre principalmente durante a fase de desenvolvimento de vários grãos quando o fungo ataca e coloniza os grãos durante períodos de alta pluviosidade. O patógeno se prolifera em grãos maduros que não foram suficientemente secos, durante a colheita ou período de armazenamento e oscilações entre temperaturas baixas (12-14°C) e altas (25-28°C) são necessárias para desencadear e manter a produção de ZEA em grãos (MARASAS et al., 1984). Estável em temperaturas acima de 150 °C, ZEA só pode ser degradada quando exposta a temperaturas mais elevadas ou sob condições de alcalinidade (EFSA, 2011).

Muita importância tem sido dada para o estudo com micotoxinas envolvendo a saúde humana e animal. Atualmente micotoxinas estão envolvidas nas cadeias alimentares de animais e humanos através da contaminação de cereais, alimentos e outras *commodities*, resultando em problemas toxicológicos e imunológicos (RILEY, 1998; ROTTER et al., 1996; SINHA; BHATNAGAR, 1998). Em amostras de grãos de cevada (safras 2007 a 2009), coletadas em regiões produtoras situadas no norte e sul do Rio Grande do Sul, foi detectada, através da amplificação de porções do *gene cluster TRI* (*TRI 3* e *TRI 12*) em genótipos *F. graminearum species complex*, a presença de DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV, sendo o genótipo 15-ADON o predominante, independentemente do ano e local (ASTOLFI et al., 2011).

Em um estudo realizado com amostras de grãos de trigo (safras 2006 a 2008), oriundas de lavouras localizadas no norte do Rio Grande do Sul, foi observada a co-contaminação de DON e NIV (com níveis médios de 540 e 337 µg/kg, respectivamente), em amostras coletadas no mesmo local e ano, embora uma variação significativa nos níveis de DON tenha sido observada entre as safras avaliadas. No Brasil, foi a primeira vez que níveis de NIV próximos aos de DON, em avaliações epidemiológicas que contemplaram vários anos, foi relatada (DEL PONTE et al., 2012). Os autores também salientam que essas informações são preocupantes para as indústrias que beneficiam trigo tendo em vista a contaminação por

micotoxinas na cadeia alimentar, especialmente pela presença de NIV, que não é regulamentada.

Micotoxinas do gênero *Fusarium* são produzidas *in vitro* e grãos de arroz e milho são utilizados como substrato sólido para o crescimento do patógeno. Para identificação de micotoxinas, técnicas como cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia de gás-líquido (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) (BETINA, 1984; COLE, 1986) podem ser utilizadas. Porém, em razão do preparo das amostras para análise por esses métodos ser muito dispendioso, sua aplicação prática torna-se muitas vezes limitada. Com isso, métodos imunológicos, considerados rápidos e baratos, têm sido utilizados. Entre esses métodos, a técnica Elisa (*enzyme-linked immunosorbent assay*), que inclui testes diversos, tem sido utilizada amplamente para análise de micotoxinas (CHU, 1996). Testes baseados nessa técnica possuem a vantagem de serem simples, quantitativos, específicos, sensíveis e requererem pequenos volumes de amostra (LÚCIO et al., 2007).

Outra técnica que pode ser utilizada para a detecção de micotoxinas é a técnica cromatográfica por imunoafinidade que pode ser considerada como uma inovação entre as metodologias para detecção de toxinas de origem biológica de baixa massa molecular. A técnica baseia-se na introdução de um componente biológico (anticorpo imobilizado em minicoluna) na etapa de limpeza, seguida de uma análise qualitativa empregando CLAE ou outras metodologias analíticas de alta sensibilidade (JURADO; JARRET, 2003; KONDO et al., 2002). Essa análise confere rapidez e especificidade no preparo de amostra (WATANABE et al., 2001; ZHAO et al., 2003) e tem sido amplamente difundida na análise de fumonisinas em milho e produtos derivados (CHENG et al., 2002), tricotecenos em milho, trigo, cevada e malte (TACKE; CASPER, 1996) e zearalenona em cereais e rações (FAZEKAS; TAR, 2001).

2.5 Controle biológico de doenças provocadas por *Fusarium* spp.

Devido à complexidade do sistema solo e da variabilidade genética existente no gênero *Fusarium*, doenças causadas por esses fungos, e entre elas a PVR da soja, são consideradas de difícil controle. Uma estratégia recomendada é a combinação de várias medidas de controle que, conjuntamente, podem fornecer resultados positivos de controle. Entre essas medidas está o controle biológico, que preconiza a utilização de micro-organismos antagonistas capazes de interferir na sobrevivência ou nas atividades determinantes da doença provocadas pelo fitopatógeno (BETTIOL; GHINI, 1995).

Nesse sentido, um dos gêneros fúngicos mais estudados e eficazes é *Trichoderma*. O gênero apresenta espécies que exercem antagonismo a vários fitopatógenos através do parasitismo e/ou antibiose e tem sido utilizada como agente de biocontrole, promotor de crescimento e na melhoria da germinação e sanidade de sementes (ETHUR et al., 2006). A forma de ação de *Trichoderma* como agente de controle biológico pode estar associada à competição por nutrientes, produção de metabólitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas da parede celular, quitinases, proteases e glucanases (PAPAVIZAS, 1985; MELO, 1991).

De acordo com Howel (2003), espécies de *Trichoderma* são capazes de suprimir o desenvolvimento de vários fungos fitopatogênicos e seus mecanismos antagonistas são influenciados pelo tipo de solo, condições de temperatura e umidade, e, também, pela microflora associada. No entanto, sua dinâmica e sobrevivência em solos com presença de compactação ainda é pouco estudada. Além disso, alguns isolados de *Trichoderma* spp. produzem, *in vitro*, enzimas quitinolíticas e glucanases que são capazes de degradar a parede celular de alguns fitopatógenos (ELAD et al., 1983).

Em um estudo que avaliou a atividade antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., em lavouras de sorgo e feijoeiro na região nordeste do México, Larralde-Corona et al. (2008) mostraram que todos os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos testes exibiram diferentes capacidades antagônicas ao patógeno, embora os isolados TCBG-2 (*Trichoderma* sp.), TCBG-3 (*Trichoderma atroviride* P. Karst.), TCBG-8 (*Trichoderma koningiopsis* Samuels, C. Suárez & H.C. Evans), e o controle positivo (*Trichoderma harzianum* Rifai IMI206040) tivessem os melhores desempenhos contra *Macrophomina phaseolina*.

O entendimento da presença e distribuição de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. no solo de diferentes culturas, em diferentes ambientes de cultivo, é importante para a elaboração de programas eficazes no biocontrole de patógenos de solo (ETHUR et al., 2008). Sivan e Chet (1989) observaram diferenças na colonização das raízes de meloeiro, algodoeiro e tomateiro por *Trichoderma harzianum* em solo irrigado e não-irrigado, enquanto na escassez de água, mesmo em solo rizosférico, o agente de biocontrole apresentou redução populacional em torno de 40%, demonstrando dificuldade em se manter no ambiente.

Alguns fitopatógenos que podem ser controlados por espécies de *Trichoderma* são *Gaeumannomyces graminis*, *Pythium* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore, *Cylindrocladium floridanum* Sobers & C.P. Seym., *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian, *Sclerotinia sclerotiorum* e outros numerosos patógenos em culturas de importância econômica (KUBICEK; HARMAN, 1998).

Apesar disso, ainda existem poucos estudos que relatem o potencial de *Trichoderma* spp. como biocontroladores de espécies patogênicas de *Fusarium* spp. (CALISTRU et al., 1997). Contudo, de acordo com relatos de Kleifeld e Chet (1992), *T. harzianum* pode sobreviver em plantas, aumentando a germinação de sementes e promovendo o crescimento do vegetal, assim como a produção de flores.

Várias espécies de *Trichoderma* spp. têm sido utilizadas em biocontrole de patógenos radiculares, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. e *Armillaria* spp. Também existem exemplos bem sucedidos de seu uso contra fungos de parte aérea, como é o caso de *Venturia* spp. e *Botrytis* spp. (MELO, 1996). Além disso, de acordo com Mukherjee e Raghu (1997), *Trichoderma* sp. apresenta capacidade antagonística à *Sclerotium rolfsii*, patógeno que causa perdas de pós-colheita e armazenamento em cenoura e beterraba.

Em um estudo que avaliou a capacidade antagonística de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 e *Trichoderma longibrachiatum* Rifai ITEM 3635 em uma lavoura de amendoim com histórico de podridão radicular causada por *Fusarium solani*, Rojo et al. (2007) verificaram que *Trichoderma harzianum* foi mais eficiente do que *Trichoderma longibrachiatum* no controle da doença. Os autores ainda ressaltaram que o uso de fungicidas para o controle desse patógeno na cultura do amendoim não possui eficácia.

Além do exposto, fungos do gênero *Trichoderma* têm demonstrado potencial de controle, em pós colheita, na produção de fumonisinas, micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp., em sementes de milho durante o armazenamento e sua utilização pode ser uma alternativa para aplicação em grãos de milho destinados, especialmente, para alimentação animal (BACON et al., 2001). Espécies de *Trichoderma* spp. também estão envolvidas em processos de decomposição, ciclagem de nutrientes e na regulação da microbiota associada ao solo (ESPOSITO; SILVA, 1998).

O controle biológico de *damping off* de pré-emergência por isolados de *Trichoderma virens* estaria relacionado à sua capacidade de degradar compostos produzidos pela semente e que estimulariam a germinação de propágulos do patógeno (HOWELL, 2002). Respostas de defesa em plantas de algodoeiro, induzidas por isolados de *Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx, foram observadas no controle de *Rhizoctonia solani* (HOWELL et al., 2000) e entre as suas interações antagonísticas estariam inclusos processos de liberação do antibiótico gliotoxin (antibiose) e sideróforos para aquisição de ferro (competição) (WILHITE et al., 2001).

2.6 Métodos moleculares baseados na análise de DNA para caracterização de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp.

Embora a utilização de marcadores morfológicos seja ainda muito utilizada para identificação de espécies dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma*, nem sempre tais características são eficientes para diferenciação de isolados. Os métodos fenotípicos algumas vezes não permitem a correta identificação das espécies desses gêneros, podendo gerar resultados conflitantes. Pelas limitações em desenvolver estudos morfológicos, os métodos moleculares podem auxiliar no esclarecimento da taxonomia (MANICOM et al., 1987), além de serem rápidos e bastante sensíveis (MENEZES et al., 2010).

A composição e sequência do material genético determinam a identidade dos seres vivos e, nesse sentido, as técnicas utilizadas para diagnóstico molecular que visem à caracterização de organismos são baseadas na análise direta ou indireta da composição e/ou da sequência de ácidos nucleicos (MARQUES, 2003). Para a discriminação de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. destaca-se a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) associada ao sequenciamento do gene Fator de Elongação-1 α (*Elongation Factor-1 α - TEF-1 α*) (O'DONNELL et al., 1998; CARBONE; KOHN, 1999; REHNER, 2001) e do Espaço Interno Transcrito (*Internal Transcribed Spacer - ITS*) (KURAMAE; SOUZA, 2002; WHITE et al., 1990), respectivamente.

A região do fator de alongação 1 α (*TEF-1 α*) em eucariotos, é altamente conservada e pertence à família das GTPases (enzimas hidrolíticas que se ligam e hidrolisam o GTP-guanosina trifosfato), que incluem fatores protéicos envolvidos no início, alongamento e fim da tradução (KEELING et al., 2004). Além disso, interações com proteínas do citoesqueleto, calmodulina e sistema proteolítico dependente de ubiquitina são outras funções celulares do TEF-1 α . Devido à sua essencialidade, o TEF-1 α é considerado uma das proteínas celulares mais evidentes (NEGRUTSKII; EL'SKAYA, 1998) e, por ser uma região altamente conservada, tem sido muito utilizada nas análises de filogenia em fungos (GENTILE et al., 2005; MOON et al., 2004). Esses genes exibem uma variabilidade muito maior do que sequências do gene β -tubulina, por exemplo, que são frequentemente utilizadas em taxonomia filogenética. Além disso, a análise de sequências TEF-1 α permite a identificação de variações intraespecíficas (AOKI; O'DONNELL, 1999).

Espécies de *Fusarium* são tradicionalmente identificadas através de características morfológicas, porém esse método é muito dispendioso e requer certo grau de *expertise* no

âmbito da taxonomia desse gênero fúngico (KRISTENSEN et al., 2007). Estudos filogenéticos realizados com *Fusarium* spp. apontaram que a região do fator de alongação 1 α (*TEF-1 α*) pode ser utilizada como uma ferramenta adequada para distinguir espécies do fungo, possuindo correlação com 16 taxa de *Fusarium* com capacidade micotoxicogênica (O'DONNELL et al., 1998; KRISTENSEN et al., 2005).

Sequências baseadas em *TEF-1 α* vêm sendo consideradas, até o momento, como o melhor marcador genético para distinguir espécies de *Fusarium* (GEISER et al. 2004; SEIFERT; LEVESQUE, 2004). Entretanto, para espécies pertencentes ao complexo *Fusarium graminearum*, essa região não seria eficiente para diferenciar as nove diferentes espécies nele agrupadas em virtude de seu polimorfismo muito limitado, não contemplando todos os indivíduos desse complexo (O'DONNELL et al., 2000b).

Muitas cópias de rDNA, tais como 18S, 5.8S e 28S, encontram-se arranjadas por espaços não codificados e as sequências codificadas do rDNA são altamente conservadas entre espécies de fungos (HILLIS; DIXON, 1991). A região do Espaço Interno Transcrito (ITS) está localizada entre os genes 18SnrDNA e 28SnrDNA e é altamente conservado na espécie, mas é variável entre espécies, motivo esse que a torna uma ferramenta frequentemente utilizada para taxonomia de gêneros e espécies (BRUNS et al., 1991; ANTONIOLLI et al., 2000; GOMES et al., 2002; LUPATINI et al., 2008), o que poderia ser associado ao fato de que as regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rapidamente, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e em seu comprimento (GERBI, 1985). Atualmente, acredita-se que essas regiões espaçadoras possuam homologia na sequência nucleotídica intra e interespecífica menor do que os genes 18S e 28S (WATANABE et al., 2011).

Quando houver grande diferença taxonômica dentro de espécies de um fungo e existirem outras espécies relacionadas, a região genômica frequentemente escolhida para estudos filogenéticos é o rDNA e, particularmente, o ITS devido à grande quantidade de sequências disponíveis (GLYNN et al., 2005). Crouch et al. (2009) testaram a utilidade de sequências obtidas dessa região para diagnosticar afiliações de espécies de *Colletotrichum* através de pesquisas de similaridade na base de dados do *GenBank* e por métodos filogenéticos (dendrogramas). Com a finalidade de descrever a posição filogenética de duas espécies de *Hypocrea* (*H. patella* Cooke & Peck e *H. neorufa* Samuels, Dodd & Lieckf.), teleomorfo de *Trichoderma* spp., Dodd et al. (2002) realizaram análises moleculares utilizando as regiões ITS do rDNA e *TEF-1 α* . Tais análises revelaram proximidade genética entre *H. patella* e o clado *Trichoderma longibrachiatum/H. schweinitzii* (Fr.) Sacc. e *H.*

neorufa e o clado *T. viride* Pers. /*H. rufa*, *T. atroviride*/*H. atroviridis* Dodd, Lieckf. & Samuels, *T. koningii* Oudem./*H. koningii* Lieckf., Samuels & W. Gams e *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg.

Embora seja muito aplicada em estudos de taxonomia molecular, a região ITS apresenta algumas desvantagens, entre elas a de que seria menos informativa do que a do gene β -tubulina na diferenciação de espécies de *Pestalotiopsis* em *Pinus armandii* Franch. e *Ribes* spp. (“*currants*” ou groselha) (HU et al., 2007). Além disso, quando associados à endonucleases de restrição, os tamanhos de fragmentos gerados pela amplificação da região ITS do rDNA não foram suficientes para diferenciar três isolados de *Trichoderma* spp. (MENEZES et al., 2010). A aplicabilidade dos *primers* ITS1 e ITS2 para estudos metagenômicos que utilizem métodos de sequenciamento com alto rendimento é questionável em função de que a quantificação, baseada no ITS, de espécies que estão em abundância no ambiente dependerá do número de cópias dessa região no respectivo genoma e isso pode variar entre diferentes espécies (FRIEDL; DRUZHININA, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e amostragem de solo

As coletas foram realizadas nos meses de maio de 2009 e maio e novembro de 2010, na semeadura de trigo após a soja; aveia preta, após a soja, e com 45 dias de idade; e aveia preta, 30 dias após a aplicação de herbicida, respectivamente. A área onde foram realizadas as coletas é integrante do Projeto Aquarius (parceria entre a UFSM - através do Setor de Uso, Manejo e Conservação do Solo (Departamento de Solos), e empresas privadas com objetivos comuns de desenvolver e difundir a Agricultura de Precisão na Região do Alto Jacuí), localizada no município de Victor Graeff - RS com coordenadas geográficas S 28°31'40" e W 52°40'18". O histórico das culturas implantadas na área entre as safras 2005-2010 é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Histórico de culturas implantadas na área onde foram realizadas as coletas de solo para quantificação de população fúngica e caracterização física do solo. Victor Graeff, RS, 2010.

Local	Safra agrícola	Cultura implantada
Área total: 50,6 ha	Inverno 05	Canola
	Verão 05/06	Soja
	Inverno 06	Trigo
	Verão 06/07	Soja
	Inverno 07	Aveia preta
	Verão 07/08	Milho
	Inverno 08	Aveia preta
	Verão 08/09	Soja
	Inverno 09	Trigo
	Verão 09/10	Soja
	Inverno 10	Aveia preta
	Verão 10/11	Soja

O solo da propriedade, segundo Embrapa (2006), está classificado como um Latossolo Vermelho e o clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfa subtropical. A temperatura média normal do mês mais quente ocorre em janeiro (24,6°C) e a do mês mais

frio em junho (12,9°C). As chuvas são distribuídas regularmente em todos os meses do ano, com precipitação oscilando entre 1.500 a 1.750 mm.

Mapas de resistência à penetração foram elaborados utilizando um Penetrômetro Geo-Referenciado PNT-2000, com ponta cônica de 30° e com área do cone de 129 mm² segundo normas ASAE S313.3. As observações foram realizadas a cada 1 cm de profundidade até uma profundidade máxima de 40 cm. Simultaneamente às avaliações de resistência à penetração, foi realizada a determinação da umidade gravimétrica do solo, nas profundidades de 0-5; 5-10; 10-20 cm de profundidade, com o auxílio de um trado calador.

Dessa forma, os tratamentos foram compostos por duas culturas: aveia preta e soja, seis níveis de compactação estabelecidos pelas medidas de resistência à penetração (Rp) (pontos com maior Rp: 3,4; 4,6 e 5,0 MPa; e menor Rp: 0,3; 1,3 e 2,2 MPa) representadas na Figura 1 através das áreas vermelhas e verdes, respectivamente, e diferentes profundidades (0-5; 5-10; 10-15 cm) de coleta. Os pontos que representavam maior Rp (P26; P21 e P29) e menor Rp (P133; P91 e P54) foram demarcados através de coordenadas geográficas (Figura 2). Foi realizada uma coleta de solo no ponto, e três a 5 m de distância em torno do mesmo.

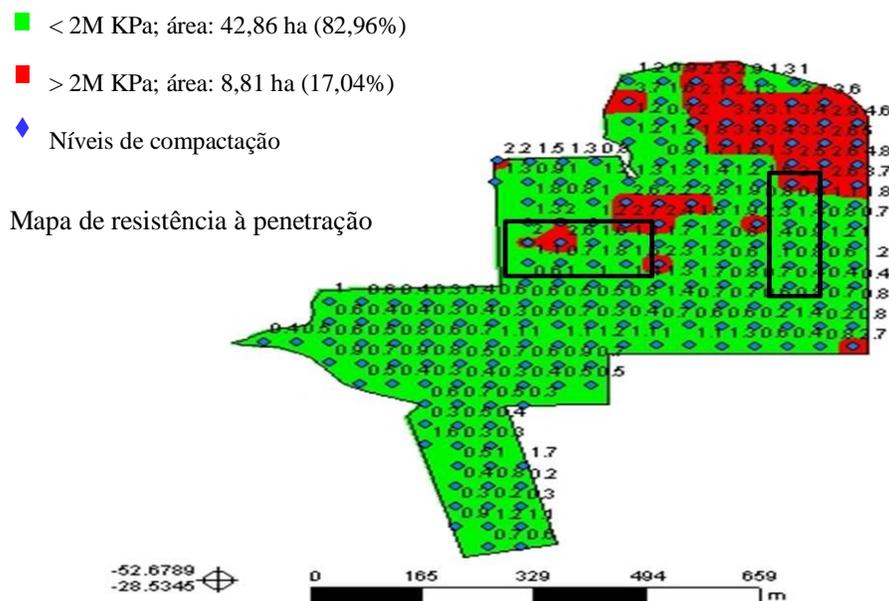


Figura 1 – Mapa de resistência à penetração (Rp) com diferentes níveis de compactação do solo, conforme penetrometria, em área localizada no município de Victor Graeff, RS. Santa Maria, 2008. Fonte: Girardello (2009).

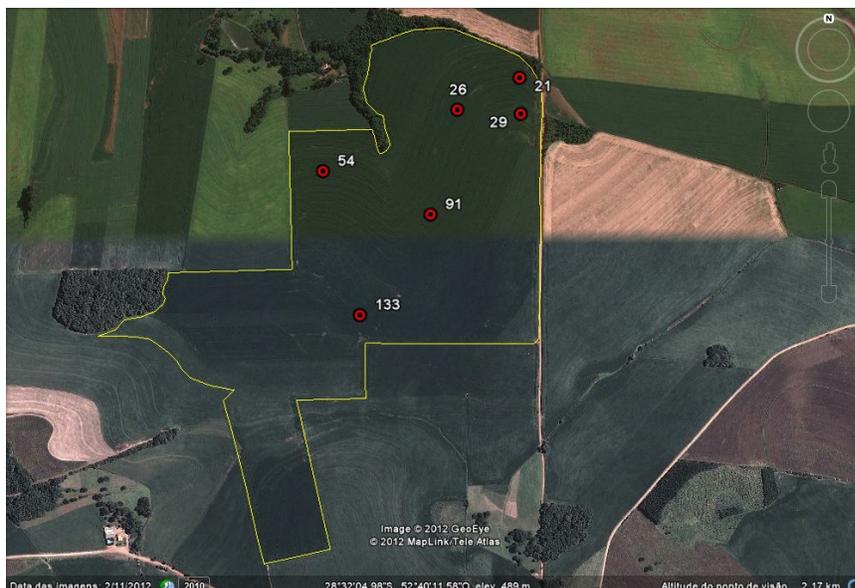


Figura 2 – Imagem de satélite contendo os pontos de coleta de solo, indicados por coordenadas GPS. Victor Graeff, 2012. Fonte: Google Earth (data da imagem: 11/02/2012).

A amostragem de solo foi realizada com auxílio de uma pá de corte. Os pontos onde foram realizadas as coletas foram definidos através de sorteio. Para cada ponto foram coletadas quatro repetições, correspondentes as repetições de campo, e a pá desinfetada com álcool 70% a cada troca entre repetições de campo. As amostras de solo, correspondentes a cada profundidade, em cada repetição de campo, foram imediatamente acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia (UFSC).

3.2 Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias)

Com as amostras de solo coletadas (Item 3.1), foram realizadas diluições seriadas de solo. Para esse procedimento, foram utilizados 10 g de solo de cada tratamento, diluídos em 90 mL de água destilada e esterilizada acrescida de duas gotas do emulsificante Tween 80[®]. A suspensão foi agitada por 30 min, em agitador do tipo Fisher – Flexa Mix[™] (USA) e, dessa suspensão, foram feitas diluições seriadas até a diluição 10⁻⁴. De cada diluição, foi retirada uma

alíquota de $0,5 \text{ mL}^{-1}$ e colocada em seis placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Anexo 1) acrescido com $0,05 \text{ mg}$ de estreptomicina/ 100 mL de meio. Após a incubação por sete dias ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h), foi contabilizado o número de UFCs dos fungos *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. Estes foram classificados quanto ao gênero através de observações das placas em microscópio estereoscópico e confecção de lâminas para observação em microscópio ótico, com base na bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999). Apesar de ter sido acrescentado antibiótico ao meio de cultura, houve crescimento de bactérias e, por isso, fez-se a contagem da população microbiana (fungos e bactérias). O número de UFCs de cada gênero fúngico foi determinado pelas seguintes equações (CARTER, 1993):

$$FD = Di \times Ds \times Q, \text{ em que:} \quad (1)$$

FD = Fator de Diluição

Di = Diluição inicial

Ds = Diluição subsequente

Q = Quantidade colocada na placa

$$UFCs = \frac{1}{FD} \times n, \text{ em que:} \quad (2)$$

$UFCs$ = Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo

FD = Fator de Diluição

n = Número de colônias contadas na placa

O delineamento experimental utilizado para a quantificação de UFCs foi o inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. Os isolados de *Fusarium* spp., encontrados nas diluições seriais de solo dos diferentes pontos de coleta e profundidades, foram cultivados em meio de cultura BDA e SNA (*Syntetic Nutrient Agar* - Anexo 3), para manutenção das características de patogenicidade para, posterior identificação morfológica. Também procedeu-se o isolamento de colônias de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA.

3.3 Determinações de densidade do solo, macroporosidade, microporosidade, porosidade total e análise química do solo

Juntamente com as coletas de solo para quantificação de UFCs, foram realizadas coletas para determinação de características físicas e químicas do solo. Amostras de solo foram coletadas com o auxílio de anéis volumétricos de aço, com volumes conhecidos, para as análises físicas de densidade (Ds), macroporosidade (Ma), microporosidade (Mi) e porosidade total (Pt) pelo método da mesa de tensão (EMBRAPA, 1979), nas profundidades de 00-05; 05-10 e 10-15 cm, com quatro repetições de campo para cada tratamento. Essas análises foram feitas no Laboratório de Física do Solo da Universidade Federal de Santa Maria. As coletas foram realizadas em maio de 2009 e maio de 2010 em virtude das características físicas do solo não sofrerem mudanças abruptas, pois se tratava de uma área sob sistema plantio direto.

A amostragem de solo para análise química foi feita nas profundidades de 00-10 e 10-20 cm, exatamente sobre o ponto GPS que indicava maior Rp ou menor Rp, com auxílio de uma pá de corte. Essa amostragem foi realizada em todas as coletas de solo, com uma amostra por ponto com diferente Rp, totalizando 12 amostras. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análises de Solos da UFSM para determinação dos níveis de nutrientes no solo (Apêndice 1).

Análise estatística: para os dados de quantificação da população microbiana, de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. primeiramente foi checado o atendimento aos pressupostos do modelo matemático. Nos casos em que o pressuposto de normalidade dos resíduos não foi atendido, a transformação $\log_{10}(x)$ foi utilizada. Após, os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey com 5% de significância, através do software estatístico Assistat versão 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Para os dados de quantificação da população microbiana, de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e das análises físicas foram relacionados utilizando correlações de Pearson através do software Statistica versão 7.0 (STATSOFT, 2004).

3.4 Caracterização morfológica de isolados de *Fusarium* spp.

As colônias de *Fusarium* spp. obtidas de diluições de solo foram purificadas conforme a técnica de cultura monospórica descrita por Fernandes (1993), em que fragmentos do micélio dos fungos foram colocados em 5 mL de água destilada e esterilizada, agitados e plaqueados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar-Água (AA) (Anexo 2). Após 24 h de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a observação dos esporos germinados em meio AA, através de microscópio ótico. Macroconídios que germinaram isoladamente foram repicados para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA (para observação da cor e mensuração da colônia), para placas de Petri contendo meio SNA e para placas de Petri contendo meio de cultura Folha de Cravo-Ágar (FCA) (Anexo 4), que permitiu a melhor caracterização de macroconídios, microconídios e clamidósporos.

Os tubos (BDA) e as placas (SNA e FCA) contendo micélio de *Fusarium* spp. foram incubados a 25 °C e fotoperíodo de 12 h entre 10-14 dias. Após esse período, o material incubado foi examinado em microscópio ótico. A morfologia das colônias (pigmentação e crescimento micelial) foi avaliada em meio BDA, no escuro a 25 °C. No meio FCA foi avaliada a forma e tamanho de macroconídios; formação e forma de microconídios e formação de clamidósporos. A identificação das espécies do fungo foi realizada de acordo com as chaves de classificação de Nelson et al. (1983), Leslie e Summerell (2006), e Gerlach e Nirenberg (1982).

3.5 Seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. com antagonismo à *Fusarium* spp. em soja e aveia preta

Nesse experimento, foram escolhidos isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. (Tabela 2) obtidos dos pontos de coleta com maiores níveis de Rp (MPa). Através do teste de confrontação direta ou cultura pareada (DENNIS; WEBSTER, 1971) (Figura 3), a ação antagonista de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Fusarium* spp. foi testada. Um disco de meio de cultura BDA de 12 mm de diâmetro contendo micélio de *Fusarium* sp. foi transferido para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro), também contendo meio BDA, a 0,5 cm da borda da placa. As placas foram incubadas durante 72 h a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, um disco de meio de cultura BDA com 12 mm de diâmetro, contendo

micélio de *Trichoderma* sp., foi transferido para a posição oposta ao disco de micélio de *Fusarium* sp. nas placas de Petri. As placas foram novamente incubadas a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h.

Aos sete dias após a repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp., foram feitas medições do diâmetro das colônias do patógeno, com o auxílio de um paquímetro digital, e agrupamento dos isolados do antagonista em classes, conforme a escala proposta por Bell et al. (1982), atribuindo-se notas que variaram de 1 a 5 (Figura 4), sendo:

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

A avaliação da classe de antagonismo foi novamente realizada aos 13 dias após a repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp. O ensaio foi realizado no delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento.

Tabela 2 – Isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. utilizados no teste de biocontrole *in vitro* e *in vivo* nas culturas da soja e aveia preta. Santa Maria, RS, 2011.

Cultura	<i>Fusarium</i> spp.		<i>Trichoderma</i> spp.	
SOJA	3,4 MPa/10-15*	F _{1s} **	3,4 MPa/0-5	T _{1s}
	3,4 MPa/5-10	F _{2s}	3,4 MPa/5-10	T _{2s}
	5,0 MPa/10-15	F _{3s}	3,4 MPa/10-15	T _{3s}
	5,0 MPa/10-15	F _{4s}	5,0 MPa/5-10	T _{4s}
			ETSR 20	T _{5s}
AVEIA PRETA	5,0 MPa/0-5 F	F _{10s}	3,4 MPa/0-5	T _{1s}
	2,2 MPa/0-5 F	F _{11s}	3,4 MPa/5-10	T _{2s}
			3,4 MPa/10-15	T _{3s}
			5,0 MPa/5-10	T _{4s}
			ETSR 20	T _{5s}
Testemunha absoluta (sem inóculo, apenas semente de soja ou aveia preta)				Test.

*Resistência à penetração e profundidade de coleta. **F_s ou T_s: isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. obtidos de solo (s).

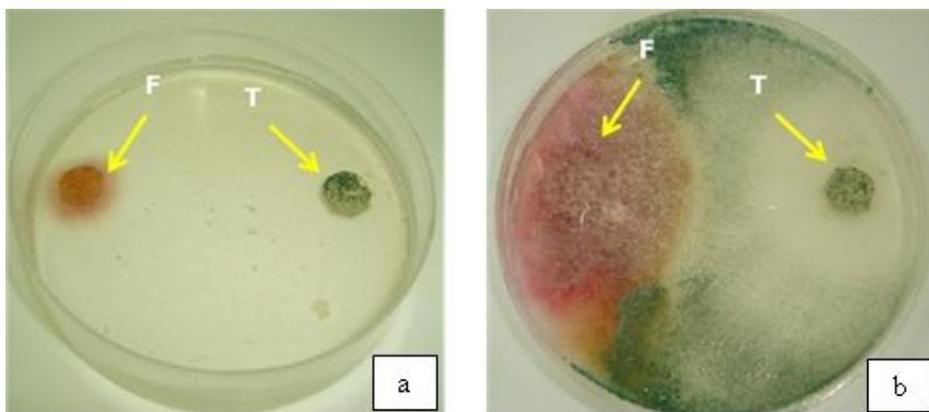


Figura 3 – Representação esquemática do teste de confrontação direta. a) *Trichoderma* sp. colocado na placa de Petri contendo meio de cultura BDA, 72 h após *Fusarium* sp.; b) mesma placa após sete dias de incubação (25 °C e fotoperíodo de 12 h). Fotos: Milanesi (2007) – Arquivo pessoal.

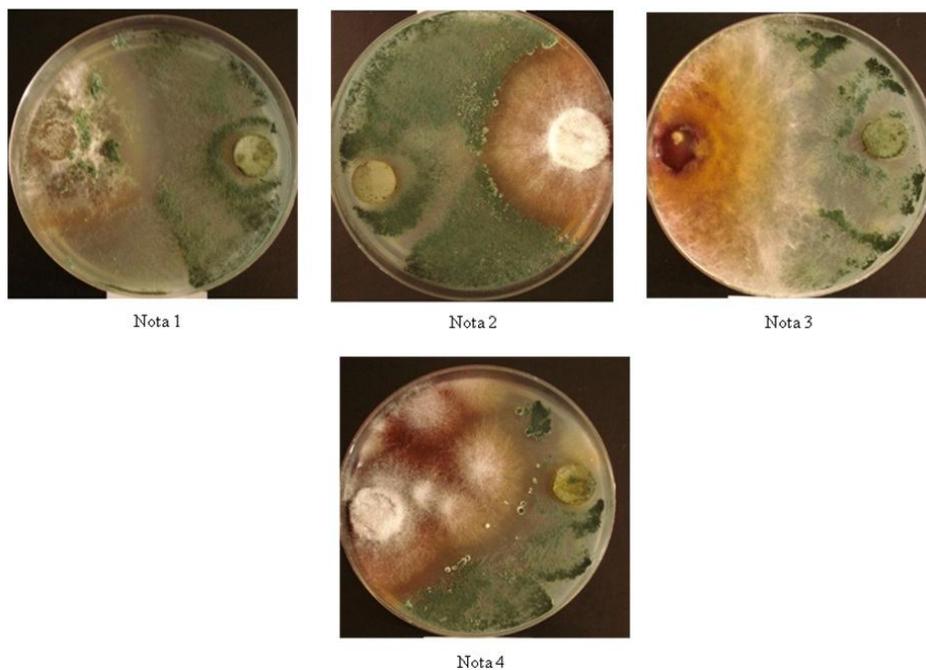


Figura 4 – Representação esquemática das notas da escala de Bell et al. (1982). Fotos: Milanesi (2007) – Arquivo pessoal.

Análise estatística: as médias das notas obtidas no teste de confrontação direta foram submetidas à análise da variância e comparação de médias através do teste de Scott-Knott com 5% de significância, com o auxílio do software Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2000).

3.6 Teste *in vivo* de isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. em plântulas de soja e aveia preta

Nesse experimento, foram utilizados cinco isolados de *Trichoderma* sp., sendo quatro de pontos com média Rp (2,2 e 3,4 MPa) e diferentes profundidades de coleta e o isolado ETSR 20 (de solo rizosférico de tomateiro cultivado em estufa) que pertence à coleção de isolados fúngicos do Laboratório de Fitopatologia da UFSM. O isolado ETSR 20 mostrou-se eficiente no controle de *F. solani* e *F. oxysporum* em tomateiro e pepineiro (ETHUR, 2005). Foram utilizados seis isolados de *Fusarium* sp., sendo quatro isolados para a soja e dois para a aveia preta, a fim de testar se tais isolados seriam ou não causadores de “*damping-off*” (tombamento de plântulas) e podridão de coroa e/ou “*damping-off*”, respectivamente (Tabela 2).

Os isolados de *Fusarium* sp. foram cultivados em grãos de milho esterilizados (KLINGELFUSS et al., 2007). Para isso, os grãos foram embebidos em água durante 24 h e, no dia seguinte, o excesso de água foi drenado. Aproximadamente 150 cm³ desses grãos foram colocados, separadamente, em frascos Erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, que foram autoclavados por duas vezes, com intervalo de 24 h. Após o resfriamento, foram transferidos para cada frasco, dez discos de meio de cultura, com 12 mm de diâmetro, contendo o micélio do patógeno. Os frascos foram incubados a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante 14 dias. Isolados de *Trichoderma* spp. selecionados para esse estudo foram cultivados em meio de cultura BDA durante 14 dias a 25 °C e fotoperíodo de 12h.

Em câmara climatizada localizada no Laboratório de Fitopatologia (CCR/UFSM), copos plásticos com capacidade para 200 mL foram preenchidos com substrato (marca Carolina Soil[®]) esterilizado por duas vezes (120 °C e 1 atm durante uma hora com intervalo de 24 h). Para a infestação do substrato, 100 g de grãos de milho colonizados por *Fusarium* sp. foram colocados em 500 mL de água destilada esterilizada e a mistura foi batida em liquidificador até a formação de uma suspensão homogênea. Antes da adição da suspensão de *Fusarium* sp., foi medida a quantidade de substrato necessária para cada tratamento sendo o mesmo colocado em bandejas e umedecido com 1 L de água destilada esterilizada e homogeneizado para melhor distribuir a umidade. Em seguida, foi medida a quantidade de suspensão do patógeno, utilizando proveta graduada, suficiente para preencher todos os copos plásticos de cada tratamento, sendo que para cada copo foram colocados 10 mL da suspensão que foi misturada ao substrato. Para determinação da quantidade de inóculo adicionada ao

substrato, uma alíquota de cada suspensão foi diluída (ETHUR, 2005) e plaqueada em meio de cultura Nash & Snyder, seletivo para *Fusarium* sp. (Anexo 5), conforme metodologia utilizada para as diluições seriadas de solo (Item 3.2). Foram contabilizadas 10^7 UFCs de *Fusarium* sp.

As unidades contendo o substrato infestado pelo patógeno, a testemunha absoluta e as unidades contendo substrato para os tratamentos que receberiam somente *Trichoderma* spp. foram acondicionados em sacos plásticos devidamente fechados e foram levados para a câmara de incubação (25 °C e fotoperíodo de 12 h) durante cinco dias. Nos tratamentos testemunha absoluta e somente *Trichoderma* spp. foram adicionados apenas 10 mL de água destilada esterilizada. Após esse período de incubação, foram adicionados 10 mL da suspensão de esporos do antagonista, para cada tratamento, e a mesma foi incorporada ao substrato (Figura 5).



Figura 5 – Teste de biocontrole in vivo em soja e aveia preta. a-b) isolado de *Fusarium* sp. cultivado em grãos de milho esterilizado; c) suspensão confeccionada a partir dos grãos colonizados; d) substrato agrícola (na quantidade necessária para um tratamento) previamente umedecido (500 mL de água destilada esterilizada) após a adição de 240 mL (10 mL x 24 copos) de suspensão de *Fusarium*; e) identificação do tratamento (os copos contendo os tratamentos testemunha – sem *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp., e somente *Trichoderma* sp., foram os primeiros a serem preenchidos) e f) todos os tratamentos em câmara úmida (25 °C e fotoperíodo de 12h). Santa Maria, RS, 2011.

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

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

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

3.7 Detecção e quantificação de zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) em isolados de *Fusarium* spp. de solo com diferentes níveis de compactação

Os isolados de *Fusarium* sp. foram cultivados em grãos de milho esterilizados (KLINGELFUSS et al., 2007). Para isso, os grãos foram embebidos em água durante 24 h e, no dia seguinte, o excesso de água foi drenado. Aproximadamente 150 cm³ desses grãos foram colocados, separadamente, em frascos Erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, que foram autoclavados por duas vezes, com intervalo de 24 h. Após o resfriamento, foram transferidos para cada frasco, cinco discos de meio de cultura, com 12 mm de diâmetro, contendo o micélio do patógeno. Os frascos foram incubados a 28 °C, no escuro, durante 20 dias (GIMENO et al., 1992). Após este período, os frascos foram colocados em estufa a 45 °C, por 3 dias, para a secagem dos grãos colonizados pelo fungo.

As etapas a seguir foram conduzidas no Laboratório de Pesquisas Micológicas/UFMSM (LAPEMI). Para a detecção de zearalenona (ZEA), foi utilizada a técnica de fluorimetria e colunas de imunoafinidade (kit Zearalatest- Vicam[®], Milford, MA). Cinco gramas do inóculo

de grãos de milho colonizados por *Fusarium* spp., que foram adicionados a 5 g de NaCl e 100 mL de metanol 80%. Esse extrato foi misturado em liquidificador por um minuto e, em seguida, filtrado através de papel qualitativo. 1 mL do extrato foi colocado em uma proveta graduada e o volume foi completado para 50 mL com o tampão PBS Tween 20 1% para filtragem em filtro de microfibras de vidro. Ao filtrado foram adicionados 8 mL do tampão PBS Tween 20 0,1% que foram passados pela coluna de imunoafinidade que contém anticorpos monoclonais capazes de reter e purificar ZEA. Esse filtrado foi colocado em uma cubeta e, em seguida, 1 mL de metanol (UV/HPLC Espectroscópico) e 1 mL de revelador foram pipetados junto da amostra, para leitura em um fluorímetro (marca Vicam®). A leitura levou 300 segundos para ser feita e os níveis de ZEA foram expressos em parte por milhão (ppm).

Para deoxinivalenol (DON), foi utilizada a técnica ELISA (kit AgraQuant Desoxinivalenol - Romer Labs®, Campinas, SP). Foram utilizados 20 g do inóculo do fungo acrescidos de 100 mL de água bidestilada para trituração em liquidificador durante um minuto. O extrato foi filtrado em filtro de microfibras de vidro sendo 5 mL adicionados à 15 mL de água bidestilada. Nos poços da placa de ELISA, foram pipetados 100 µL da solução conjugada para DON acrescidos de 50 µL do padrão zero (no primeiro poço) e, no segundo poço, foi colocada a solução conjugada para DON e 50 µL do padrão 0,25. Na sequência, pipetaram-se 50 µL de cada amostra que foram misturadas três vezes a solução conjugada e, em seguida, foram transferidos para poços correspondentes em uma nova placa. As amostras foram incubadas durante 15 minutos e a placa foi lavada (por cinco vezes) com solução de lavagem para DON e enxugada em papel toalha. Posteriormente, 100 µL da solução substrato foram adicionados às amostras e uma nova incubação (de cinco minutos) foi realizada e pode-se observar o surgimento de uma coloração azul em alguns poços que foi o indicativo da presença da toxina. Depois dessa etapa, 100 µL da solução STOP foram pipetados e as amostras foram colocadas em leitor de ELISA e os níveis de DON foram expressos em partes por milhão (ppm).

Os resultados informaram quais os isolados de *Fusarium* spp. foram, ou não, produtores de ZEA e DON, assim como a sua quantificação.

3.8 Caracterização molecular dos isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp.

Foram encaminhados para a caracterização molecular, todos os isolados de *Fusarium* spp. e os isolados de *Trichoderma* spp. que foram utilizados no teste de biocontrole *in vitro* e *in vivo*. Essa etapa foi executada no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, onde foi realizada a extração do DNA do patógeno, conforme o método CTBA descrito por Doyle e Doyle (1991). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) para a amplificação da região TEF-1 α (em *Fusarium* spp.) e ITS (em *Trichoderma* spp.) do rDNA. Para a amplificação, foi utilizado um fragmento com aproximadamente 1100 pb do gene codificador do fator de alongação alfa com o par de oligonucleotídeos iniciadores EF1-T (*forward*; ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1-1567R (*reverse*; ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) (REHNE E BUCKLEY, 2005). Para a amplificação da região ITS do rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (*forward*; 5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (*reverse*; 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (WHITE et al., 1990).

A reação continha aproximadamente 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5 μ M de cada dNTP, 20 nM de MgCl₂, 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, cinco unidades da enzima Taq polimerase e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em um termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições: 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 35 s e 72 °C por 10 min. Ao final da reação, os produtos da PCR foram mantidos a 4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE 1X, contendo brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 a 13% e os fragmentos gênicos foram sequenciados nas direções senso e antisenso em sequenciador MEGA BACE 500™ (Amersham). Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999) e as sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as já existentes na base de dados *GenBank* do National Center for Biotechnological Information – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências do *GenBank* que apresentaram as melhores coberturas e os maiores escores de similaridade foram selecionadas e alinhadas juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) e a análise filogenética foi conduzida utilizando-se

o método “*Neighbor-joining*” (para *Fusarium* spp.) e de Máxima Verossimilhança (para *Trichoderma* spp.) com 5000 replicatas pelo programa MEGA versão 5 (TAMURA et al, 2007). Para construção dos dendrogramas, foram utilizadas as sequências de *Fusarium* spp. (TEF-1 α) e *Trichoderma* spp. (ITS) (Tabela 3).

Tabela 3 - Informações do *GenBank* para os isolados de *Fusarium* spp. (região TEF-1 α) e *Trichoderma* spp. (região ITS) utilizados neste estudo. Santa Maria, 2012.

Isolado	Origem	Número de acesso	Cobertura (%)	Identidade dos isolados deste trabalho com sequências do GenBank (%)	Referência
<i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 52937	EUA	JF740878	93	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 52763	EUA	JF740837	93	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 52698	EUA	JF740781	93	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 52694	EUA	JF740777	93	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 52752	EUA	JF740827	93	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Gibberella intermedia</i> NRRL52716	EUA	JF740798	92	97	O'Donnell et al., 2011
<i>Gibberella intermedia</i> NRRL25096	EUA	JF740723	92	97	O'Donnell et al., 2011
<i>Gibberella intermedia</i> NRRL 52696	EUA	JF740779	92	97	O'Donnell et al., 2011
<i>Gibberella intermedia</i> NRRL 52687	EUA	JF740773	92	97	O'Donnell et al., 2011
<i>Gibberella intermedia</i> NRRL 25103	EUA	JF740730	92	97	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium solani</i> NRRL 52798	EUA	JF740866	92	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium solani</i> NRRL 52778	EUA	JF740846	92	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium solani</i> NRRL 25083	EUA	JF740714	92	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium solani</i> NRRL 52715	EUA	JF740797	92	97	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium solani</i> NRRL 52704	EUA	JF740786	92	97	O'Donnell et al., 2011
<i>Gibberella zeae</i> NRRL 52929	EUA	JF740871	93	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Gibberella zeae</i> NRRL 52799	EUA	JF740867	93	99	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium austroamericanum</i> NRRL 52762	EUA	JF740836	93	98	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium meridionale</i> NRRL 52760	EUA	JF740835	93	98	O'Donnell et al., 2011
<i>Fusarium culmorum</i> NRRL 52792	EUA	JF740860	93	97	O'Donnell et al., 2011

Tabela 3 – Continuação...

Isolado	Origem	Número de acesso	Cobertura (%)	Identidade dos isolados deste trabalho com sequências do GenBank (%)	Referência
<i>Fusarium avenaceum</i> LMSA 1.09.140	França	JF278602	97	99	Vasseur (2011)
<i>Fusarium avenaceum</i> LMSA 1.09.142	França	JF278604	97	99	Vasseur (2011)
<i>Fusarium avenaceum</i> LMSA 1.09.139	França	JF278601	95	99	Vasseur (2011)
<i>Fusarium avenaceum</i> CC32	Reino Unido	EU744840	90	99	Stenglein et al., 2010
<i>Gibberella avenacea</i> F066	Canadá	HQ020463	90	99	Holtz et al., 2010
<i>Trichoderma asperellum</i> SHBS2013	China	JQ040320	100	99	Sun (2011)
<i>Trichoderma asperellum</i> HNX1	China	JQ040316	100	99	Sun (2011)
<i>Trichoderma asperellum</i> HNCS4014	China	JQ040315	100	99	Sun (2011)
<i>Trichoderma asperellum</i> 400/01	Brasil	HQ857121	100	99	Lopes et al., 2011
<i>Hypocrea lixii</i> strain T14	Índia	HQ259991	100	99	Sharma; Henry (2010)
<i>Trichoderma koningiopsis</i> SHSJ8001	China	JQ040369	100	99	Sun (2011)
<i>Trichoderma koningiopsis</i> DMC 795b	Alemanha	EU718083	100	99	Douanla-Meli; Langer (2008)
<i>Trichoderma koningiopsis</i> GJS 04-199	EUA	FJ442654	100	99	Chaverri et al., 2008
<i>Trichoderma koningiopsis</i> GJS 04-319	EUA	FJ442215	100	99	Chaverri et al., 2008
<i>Hypocrea koningii</i> CY059	Brasil	HQ607942	100	99	Rodrigues et al., 2011
<i>Trichoderma tomentosum</i> 364/02	Brasil	HQ857116	100	99	Lopes et al., 2011
<i>Trichoderma tomentosum</i> MIAE00032	França	HM176562	100	99	Anees et al., 2010
<i>Trichoderma tomentosum</i> DAOM 17873A	Canadá	EU280072	100	99	Hoyos-Carvajal et al., 2007
<i>Trichoderma tomentosum</i> MIAE00031	França	HM176561	100	99	Anees et al., 2010
<i>Hypocrea lixii</i> DAOM 231617	Austria	AY605754	100	98	Druzhinina et al., 2004

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias)

A quantificação de UFCs permitiu conhecer a relação populacional de *Fusarium* e *Trichoderma* e de outras populações (fungos e bactérias), na área em que foram realizadas as coletas de solo, cultivada com soja e aveia preta (Figuras 6, 7 e 8). Observou-se que não houve diferença significativa nas populações, tanto na mesma profundidade quanto em profundidades diferentes. Contudo, pode-se notar uma menor população de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. na camada entre 0-5 cm (Figura 6 A), o que pode ter sido reflexo da grande quantidade de outras populações encontradas e nela a possível existência de micro-organismos antagonistas àqueles fungos.

Uma população mais homogênea foi observada na camada entre 5-10 cm (Figura 6 B), sendo a quantidade de UFCs de *Fusarium* spp. e de outros muito próximas. Em sistema plantio direto tem sido evidenciado um aumento na compactação superficial do solo (GENRO JUNIOR et al., 2004), geralmente na camada entre 7-15 cm (STONE; SILVEIRA; 2001), o que reduz sua aeração. Nessas camadas, pode ocorrer a produção de compostos tóxicos que são exsudados pelas raízes. Esses compostos são provenientes de rotas metabólicas realizadas no tecido radicular e que estão presentes somente em condições de anaerobiose e, podem estimular a atividade de fitopatógenos (TAIZ; ZEIGER, 2005). Com relação à *Trichoderma* spp., menores populações foram encontradas nos pontos de coleta com 4,6; 5,0 e 2,2 MPa, respectivamente.

Na camada entre 10-15 cm (Figura 6 C), as populações comportaram-se de maneira semelhante ao observado anteriormente, havendo um aumento na quantidade de UFCs de *Trichoderma* spp. nessa camada. Esse dado poderia ser explicado pelo fenômeno de percolação da água, que pode alterar a distribuição de fitopatógenos, e outros micro-organismos, ao longo do sistema radicular (GRAY; POPE, 1986).

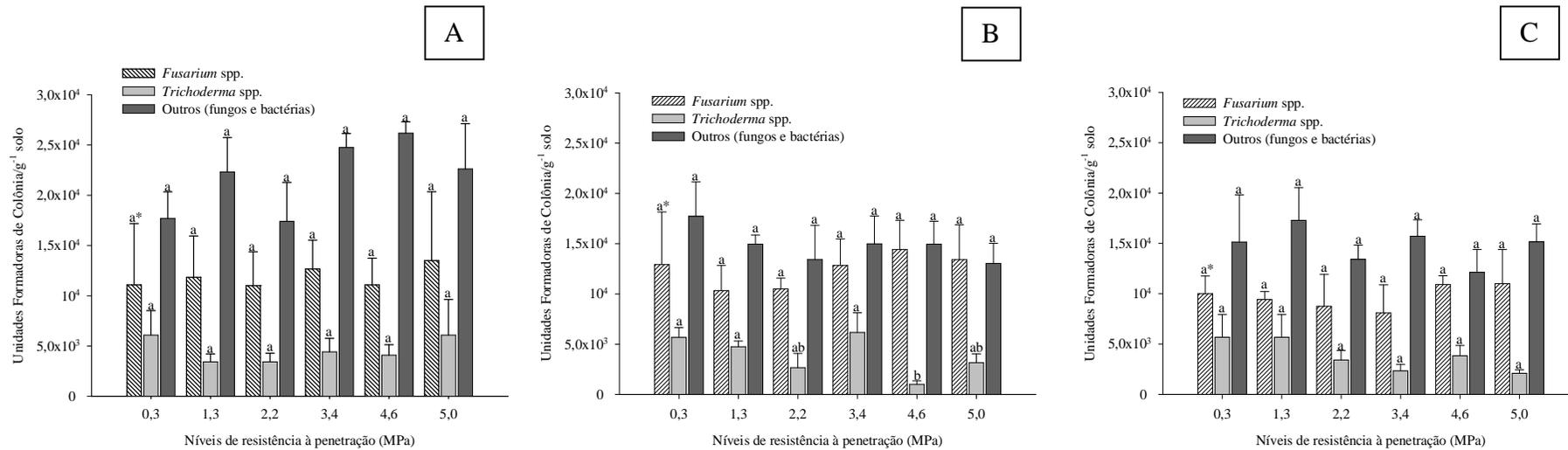


Figura 6 – População de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias) após a colheita de soja (safra 2009), nas camadas de 00-05 cm (A); 05-10 cm (B); e 10-15 cm (C), para diferentes níveis de resistência à penetração (MPa) em um Latossolo vermelho. Santa Maria, 2011. (*) Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam o desvio padrão.

Para a coleta realizada no cultivo de aveia preta (com 45 dias de idade), após a soja, as populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foram muito reduzidas (Figura 7), e isto foi verificado para as três profundidades de coleta. Houve diferença estatística para UFCs de *Fusarium* spp. e, na camada de 0-5 cm (Figura 7 A), a maior população ocorreu no ponto com 4,6 MPa de resistência à penetração. Esse resultado foi observado também para a camada entre 5-10 cm. Além disso, maior população do fungo ocorreu na camada de 10-15 cm nos pontos de coleta em que a Rp era de 4,6 e 5,0 MPa, porém ambas não diferiram estatisticamente entre si (Figura 7 C).

Com relação à *Trichoderma* spp., a população obteve médias de UFCs bastante próximas daquelas encontradas para *Fusarium* spp. Houve diferença estatística em sua população na camada de 0-5 cm, sendo que um pequeno aumento foi observado no ponto com 1,3 MPa de Rp (Figura 7 A). Ainda, nenhuma diferença estatística foi obtida nas coletas de solo realizadas nas camadas entre 5-10 e 10-15 cm (Figuras 7 B e 7 C). Em contrapartida, a quantidade de UFCs de outros micro-organismos manteve-se em níveis mais elevados, independentemente da profundidade de coleta das amostras de solo.

Essa tendência também foi observada para a coleta realizada em cultivo de aveia, 30 dias após a aplicação do herbicida glifosato (Figura 8). As populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. mantiveram-se em níveis reduzidos (Figuras 8 A e B), sem diferença estatística, enquanto que a população de outros atingiu médias de UFCs mais elevadas (Figura 8 C).

Comparando-se as populações presentes em solo cultivado com soja e aveia (antes e após a aplicação de herbicida glifosato), notou-se uma redução significativa na quantidade de UFCs de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. Na soja, é possível que condições ambientais adequadas ao seu estabelecimento e o desenvolvimento de relações parasitárias estáveis, tenham favorecido a população de *Fusarium* spp. Além disso, *Trichoderma* spp. foi capaz de se manter no ambiente, podendo ter exercido atividade antagônica à *Fusarium* spp. Fungos do gênero *Trichoderma* possuem elevada capacidade reprodutiva e são muito hábeis em sobreviver sob condições desfavoráveis. Estes fungos são eficientes quanto à utilização de nutrientes e possuem a capacidade de modificar a rizosfera que habitam (WOO et al., 2005).

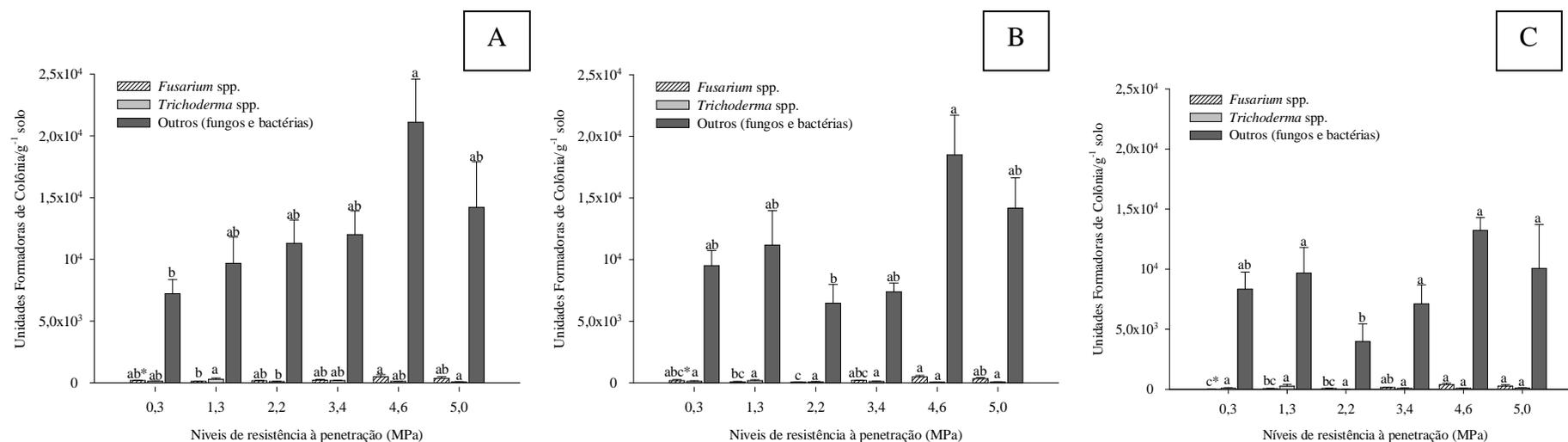


Figura 7 – População de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias) 45 dias após o plantio de aveia (safra 2010), nas camadas de 00-05 cm (A); 05-10 cm (B); e 10-15 cm (C), para diferentes níveis de resistência à penetração (MPa) em um Latossolo vermelho. Santa Maria, 2011. (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam o desvio padrão.

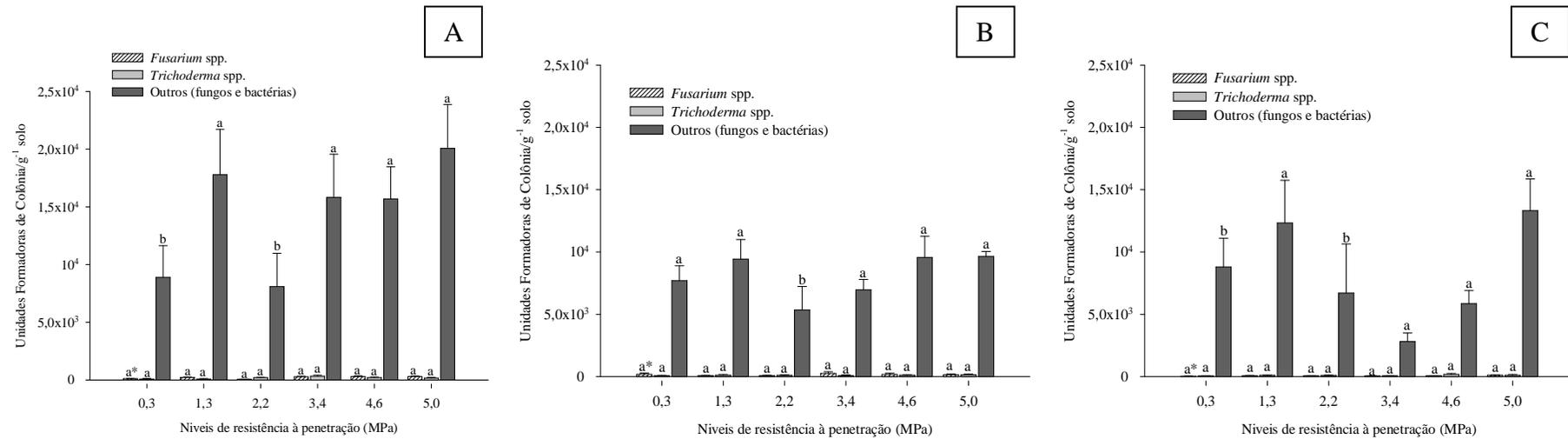


Figura 8 – População de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias) 30 dias após dessecação de aveia (safra 2010), nas camadas de 00-05 cm (A); 05-10 cm (B); e 10-15 cm (C), para diferentes níveis de resistência à penetração (MPa) em um Latossolo vermelho. Santa Maria, 2011. (*) Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam o desvio padrão.

Ainda, na coleta realizada após o cultivo de soja, notou-se que para as outras populações (fungos e bactérias), em relação à *Fusarium* spp., foi mais equilibrada, o que poderia ser atribuído à presença, nas outras populações, de micro-organismos produtores de metabólitos secundários que seriam prejudiciais para *Fusarium* spp. Esse fato foi mais evidenciado nos pontos com maior Rp (3,4 e 4,6 MPa), na camada de 0-5 cm e, nos pontos com menor Rp (0,3 e 1,3 MPa), para o solo coletado entre 5-10 e 10-15 cm. Para esta última, pode-se ressaltar também um maior efeito dos outros (fungos e bactérias) sobre *Fusarium* spp. nos pontos com 3,4 MPa de resistência à penetração. A redução abrupta ocorrida nas populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e, as outras populações prevalecendo sobre essas, podem estar associadas ao efeito rizosférico do cultivo de aveia.

Algumas espécies vegetais podem liberar, através das raízes, compostos tóxicos. Esse fenômeno é denominado alelopatia, e pode ser definido como a capacidade que os vegetais têm de produzir substâncias químicas, com ação inibidora ou estimuladora, sobre outras plantas e micro-organismos do solo (RICE, 1984; FRITZ et al., 2007). Com a expansão do sistema de plantio direto na palha, a utilização de plantas de cobertura assim como a rotação de culturas tornaram-se condições essenciais para o adequado estabelecimento dessa prática conservacionista. No entanto, é provável que a palhada continue liberando compostos alelopáticos (ARAÚJO; RODRIGUES, 2000).

O crescimento e a atividade dos micro-organismos do solo é limitado, principalmente, pela disponibilidade de carbono (DEMOLING et al., 2007). Uma das formas de obtenção desses compostos são os exsudatos radiculares (MARSCHNER et al., 2011), cuja liberação provoca maior atividade metabólica e densidade microbiana na rizosfera (SODERBERG; BÅÅTH, 1998). A diversidade das populações microbianas nesse ambiente é dependente da quantidade e da composição dos exsudatos liberados pelas raízes. Estes variam conforme a espécie vegetal e também ao longo do sistema radicular (MARSCHNER et al., 2011).

Com relação às populações quantificadas neste estudo, em aveia preta com 45 dias de idade e, após 30 dias de sua dessecação, é possível que tenha havido efeito alelopático da cultura sobre os fungos *Fusarium* e *Trichoderma*, o que implicou na redução de suas populações. Provavelmente, os indivíduos contabilizados nas UFCs de outros (fungos e bactérias), poderiam ser em sua maioria saprófitas que, por não utilizar diretamente os exsudatos produzidos pelas raízes da aveia preta como fonte de carbono, seriam mais resistentes e/ou tolerantes à ação dos compostos alelopáticos produzidos pelas plantas. Na soja, tal ação não foi evidenciada, o que provocou maior equilíbrio entre as populações de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outras.

4.2 Correlações entre *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., outros (fungos e bactérias) e características físicas do solo

Para a primeira coleta realizada após a safra de soja de 2009, houve correlação entre as variáveis de características físicas do solo: níveis de resistência à penetração (Rp), densidade do solo (Ds), macroporosidade (Ma), microporosidade (Mi) e porosidade total (Pt), que apresentaram coeficientes positivos ou negativos, confirmando a existência de compactação no solo (Tabela 4).

Tabela 4 – Correlações entre propriedades físicas do solo e populações (Unidades Formadoras de Colônias – UFCs) de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias), após cultivo de soja (sob sistema plantio direto) em área com diferentes níveis de resistência à penetração e diferentes profundidades, na safra 2009. Santa Maria, RS, 2010.

	Rp	Ds	Ma	Mi	Pt	Fus.	Tr.	Outros
00-05 cm								
Rp	1							
Ds	0,42*	1						
Ma	-0,15 ^{ns}	-0,46*	1					
Mi	-0,27 ^{ns}	-0,39 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	1				
Pt	-0,34 ^{ns}	-0,69*	0,63*	0,60*	1			
Fus.	0,30 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,28 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,13 ^{ns}	1		
Tr.	0,01 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,43*	-0,35 ^{ns}	0,03 ^{ns}	1	
Outros	0,26 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,33 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	1
05-10 cm								
Rp	1							
Ds	0,76*	1						
Ma	-0,60*	-0,74*	1					
Mi	0,40 ^{ns}	0,24 ^{ns}	-0,48*	1				
Pt	-0,37 ^{ns}	-0,64*	0,75*	0,21 ^{ns}	1			
Fus.	0,16 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,25	1		
Tr.	-0,37 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	0,49*	-0,53*	0,15 ^{ns}	0,02 ^{ns}	1	
Outros	-0,22 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,38 ^{ns}	1
10-15 cm								
Rp	1,00							
Ds	0,71*	1,00						
Ma	-0,43*	-0,44*	1,00					
Mi	0,33 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,78*	1,00				
Pt	-0,15 ^{ns}	-0,43*	0,33 ^{ns}	0,34 ^{ns}	1,00			
Fus.	-0,09 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	1,00		
Tr.	-0,45*	-0,20 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,18 ^{ns}	1,00	
Outros	0,15 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,30 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	0,21 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1,00

Rp: Resistência à penetração; Ds: Densidade do solo; Ma: Macroporosidade; Mi: Microporosidade; Pt: Porosidade total; Fus.: *Fusarium* spp.; Tr.: *Trichoderma* spp.; Outros (fungos e bactérias). *Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ^{ns} não significativo.

Na profundidade 00-05 cm, houve uma correlação negativa (-0,43) entre Mi e Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de *Trichoderma* spp., mostrando que o fungo necessita de um ambiente bem aerado e sem umidade excessiva para o seu desenvolvimento.

Um solo compactado não apenas é drenado mais lentamente, mas também possui menor capacidade de retenção de água e, conseqüentemente, maior umidade, em relação a um solo não compactado. Além disso, entre os problemas associados à compactação do solo pode-se mencionar que este se torna mais propenso a inundações temporárias. Esta situação pode acarretar a produção de substâncias tóxicas para as plantas (PATRICK et al., 1964) e reduzir a aeração do sistema radicular, em uma situação conhecida como anóxia, predispondo as plantas a uma maior incidência de doenças radiculares (TU, 1994).

Quando o oxigênio molecular não está disponível, por exemplo, raízes em solos alagados ou sistema radicular submetido a uma condição de compactação do solo, a glicólise pode ser a fonte principal de energia para as células. Para isso, as rotas fermentativas, que estão localizadas no citosol, reduzem o piruvato para reciclar o NADH produzido na glicólise, gerando assim a energia necessária para a manutenção de seus tecidos. Durante a anaerobiose, mais de 17 hidrocarbonetos podem ser sintetizados e exsudados por raízes. Esses compostos e outros, que são produzidos no solo durante a anóxia (ausência de O₂) são tóxicos para as raízes e também podem estimular a atividade de fitopatógenos (TAIZ; ZEIGER, 2005).

Correlações entre Ma e Mi e UFCs de *Trichoderma* spp. (0,49 e -0,53, respectivamente) também foram observadas na profundidade de coleta 05-10 cm (Tabela 4). As demais características físicas se correlacionaram entre si. Para a profundidade 10-15 cm, houve correlação negativa (-0,45) entre Rp e UFCs de *Trichoderma* spp. Pode-se perceber que para UFCs de *Fusarium* spp. e população microbiana, para a primeira coleta, não houve correlações com as características físicas do solo, fato que pode ser devido à rotação de culturas utilizada na área.

Na safra 2008/2009, a área foi cultivada com soja e durante o inverno de 2009 houve plantio de trigo. Sistemas de cultivo podem provocar inúmeras alterações no solo, afetando a distribuição de água no perfil, aeração, compactação, porosidade e temperatura. Tais fatores possuem influência direta sobre a atividade biológica de fitopatógenos assim como sobre o desenvolvimento de doenças (NESCI et al., 2006).

Na segunda coleta (Tabela 5), realizada em maio de 2010, pode-se verificar, na profundidade de 00-05 cm, correlações entre Rp e UFCs de *Fusarium* spp. (0,50) e população microbiana (0,53) e entre Ds e UFCs de *Trichoderma* spp. (-0,51). Esses resultados apontam um benefício maior para as populações de *Fusarium* spp. à medida que a compactação do solo

aumenta e isso poderia predispor a planta a incidência de podridões radiculares causadas por fungos desse gênero. Em feijoeiro, observou-se que houve uma redução na compensação do crescimento radicular, devido ao efeito de camadas de solo compactado, em função da maior pressão de inóculo de *Fusarium* spp. (MILLER; BURKE, 1975). Além disso, resíduos de leguminosas favorecem o aumento da população de *Fusarium* spp. independentemente do sistema de cultivo utilizado (TOLEDO-SOUZA et al., 2008).

Tabela 5 – Correlações entre propriedades físicas do solo e populações (Unidades Formadoras de Colônias – UFCs) de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias), em cultivo de aveia preta (45 dias de idade) após soja (sob sistema plantio direto), em área com diferentes níveis de resistência à penetração e diferentes profundidades, na safra 2010. Santa Maria, RS, 2010.

	Rp	Ds	Ma	Mi	Pt	Fus.	Tr.	Outros
00-05 cm								
Rp	1							
Ds	0,31 ^{ns}	1						
Ma	-0,69*	-0,26 ^{ns}	1					
Mi	0,47*	-0,36 ^{ns}	-0,80*	1				
Pt	0,07 ^{ns}	-0,66*	-0,33 ^{ns}	0,63*	1			
Fus.	0,50*	0,14 ^{ns}	-0,26 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,02 ^{ns}	1		
Tr.	-0,27 ^{ns}	-0,51*	0,24 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,35 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	1	
Outros	0,53*	-0,13 ^{ns}	-0,31 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,77*	-0,23 ^{ns}	1
05-10 cm								
Rp	1							
Ds	0,34 ^{ns}	1						
Ma	-0,45*	-0,70*	1					
Mi	0,25 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	1				
Pt	-0,34 ^{ns}	-1,0*	0,73*	0,28 ^{ns}	1			
Fus.	0,55*	0,30 ^{ns}	-0,54*	0,40 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	1		
Tr.	-0,45*	-0,30 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,30 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	1	
Outros	0,40 ^{ns}	0,30 ^{ns}	-0,59*	0,35 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	0,68*	0,00 ^{ns}	1
10-15 cm								
Rp	1							
Ds	0,41*	1						
Ma	-0,62*	-0,80*	1					
Mi	0,31 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	1				
Pt	-0,41*	-1,00*	0,75*	0,33 ^{ns}	1			
Fus.	0,52*	0,10 ^{ns}	-0,46*	0,52*	-0,10 ^{ns}	1		
Tr.	-0,24 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	0,31 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,30 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	1	
Outros	0,24 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,54*	0,23 ^{ns}	1

Rp: Resistência à penetração; Ds: Densidade do solo; Ma: Macroporosidade; Mi: Microporosidade; Pt: Porosidade total; Fus.: *Fusarium* spp.; Tr.: *Trichoderma* spp.; Outros (fungos e bactérias). * Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ^{ns} não significativo.

Em uma condição de alta densidade do solo, populações de *Trichoderma* spp. seriam prejudicadas, e isso pode ser demonstrado pelos resultados obtidos neste trabalho. Contrariamente, Woo et al. (2005) descreveram *Trichoderma* spp. como um fungo capaz de sobreviver em condições de solo muito desfavoráveis para seu estabelecimento. Devido a essa máxima, muitos estudos sobre a comunidade de *Trichoderma* spp., em diferentes sistemas de cultivo, vêm sendo conduzidos, visando resultados que apontem alterações conforme o manejo de solo adotado (LIU et al., 2008). Os efeitos da Rp sobre as populações de *Fusarium* spp. (0,55) e *Trichoderma* spp. (-0,45) se repetiram na profundidade de 05-10 cm do perfil do solo. Além disso, também houve efeito negativo da Ma sobre UFCs Totais (-0,59).

Conforme a população de *Fusarium* spp. aumentava, também aumentavam as UFCs Totais (0,68) e esse dado se repetiu para a profundidade de 10-15 cm com um coeficiente de correlação igual a 0,54. O acompanhamento da dinâmica de comunidades microbianas totais do solo é de fundamental importância, visto que elas podem impactar a ocorrência de uma determinada doença (LIU et al., 2008). Nessa profundidade também se pode observar para UFCs de *Fusarium* spp. correlações significativas com Rp (0,52), Ma (-0,46) e Mi (0,52), enfatizando a ideia de que populações desse fungo preferem habitar ambientes de solo mais compactado. Fungos do gênero *Fusarium* são componentes biológicos muito importantes nos solos de ecossistemas agrícolas e, por isso, o conhecimento de como as práticas de manejo de solo afetam as populações desse fungo, poderão implicar em maior eficiência dos métodos de controle de doenças que serão utilizados na área (WAKELIN et al., 2008).

Os fungos são muito importantes sob o ponto de vista da biomassa do solo. Nele, contribuem para a ciclagem de nutrientes; agregação de partículas, através da produção de substâncias adesivas, e podem afetar a infiltração de água no solo em virtude de produzirem altas quantidades de determinadas substâncias hidrofóbicas. Porém, o perfil da distribuição de água no solo é um fator crucial para o desenvolvimento ou a morte das populações fúngicas e suas atividades (RITZ; YOUNG, 2004).

Para a terceira coleta (Tabela 6), realizada em outubro de 2010, não foram determinadas as características físicas do solo em função destas mudarem pouco em um mesmo ano agrícola. Logo, pode-se observar correlações positivas entre Rp e UFCs de *Fusarium* (0,41) e UFCs de *Fusarium* e Totais (0,68) na profundidade de 00-05 cm do perfil do solo. Na camada de 10-15 cm correlações positivas entre Rp e UFCs de *Trichoderma* (0,41) e entre UFCs de *Fusarium* e *Trichoderma* (0,64) foram obtidas. Na profundidade de 05-10 cm, não houve correlações com coeficientes significativos.

Tabela 6 – Correlações entre as populações (Unidades Formadoras de Colônias – UFCs) de *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias), em cultivo de aveia preta (30 dias após aplicação do herbicida glifosato), em área com diferentes níveis de resistência à penetração e diferentes profundidades, na safra 2010. Santa Maria, RS, 2010.

	Rp	Fus.	Tr.	Outros
00-05 cm				
Rp	1			
Fus.	0,41*	1		
Tr.	0,37 ^{ns}	0,10 ^{ns}	1	
Outros	0,34 ^{ns}	0,68*	0,10 ^{ns}	1
05-10 cm				
Rp	1			
Fus.	0,05 ^{ns}	1		
Tr.	0,09 ^{ns}	-0,28 ^{ns}	1	
Outros	0,37 ^{ns}	0,25 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	1
10-15 cm				
Rp	1			
Fus.	0,28 ^{ns}	1		
Tr.	0,41*	0,64*	1	
Outros	0,11 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	1

Rp: Resistência à penetração; Fus.: *Fusarium* spp.; Tr.: *Trichoderma* spp.; Outros (fungos e bactérias). *Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ^{ns} não significativo.

Esses resultados poderiam ser explicados pela presença de aveia preta que, mesmo dessecada, ainda estaria contribuindo com algum efeito de sua rizosfera e rizoplano sobre as populações fúngicas, já que as coletas foram realizadas em uma área conduzida sob sistema plantio direto, no qual a cultura possui importante papel como planta de cobertura de solo. A distribuição das raízes é fortemente influenciada pela densidade da camada de solo e também pela cultivar utilizada (MILLER; BURKE, 1985).

Rotações de culturas têm sido utilizadas tradicionalmente como uma estratégia teoricamente eficaz no controle de muitas doenças veiculadas pelo solo. Porém, para a maioria dos patógenos (e entre eles diversas espécies de *Fusarium*) podem sobreviver por um longo período de tempo, colocando em cheque a viabilidade da utilização de determinados esquemas de rotações de culturas, em virtude da ocorrência de doenças em níveis epidêmicos (KING et al., 2008).

Em contrapartida, diversos são os benefícios que esse sistema de cultivo apresenta, sob o ponto de vista da conservação do solo e dos mananciais. Porém, o plantio direto pode levar

ao aumento da densidade do solo (VASQUEZ et al., 1991) e, conseqüentemente, causar compactação de camadas no perfil do solo, principalmente naqueles com problemas de drenagem (CULLEY et al., 1987). Outro efeito negativo desse sistema de cultivo são as baixas temperaturas do solo, que causam um atraso na germinação de sementes e tornam as culturas mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças (JACKSON et al., 2002).

Ainda são muitas as lacunas que poderiam explicar uma maior ou menor ocorrência de doenças radiculares em cultivos agrícolas. O conhecimento de que solos mais adensados favorecem seus agentes causais é um assunto bastante recorrente na comunidade científica, embora o conhecimento dos efeitos pontuais da compactação sobre o microcosmo do solo seja limitado. No caso da PVR em soja, acredita-se que um solo com maior teor de umidade e com baixas temperaturas na região da rizosfera seriam condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (SCHERM et al., 1996).

4.3 Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Fusarium* spp.

Nesse estudo foram identificados 13 isolados de *Fusarium* spp. obtidos a partir de diluições de solo (Tabela 7 e Figuras 9 e 10). As espécies encontradas foram *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. avenaceum*. É possível que uma maior frequência dessas espécies esteja relacionada ao histórico de culturas implantadas na área onde as amostras de solo foram coletadas (Tabela 1).

Como fungos do gênero *Fusarium* podem sobreviver em restos culturais e na matéria orgânica do solo (BEDENDO, 1995), é possível que os indivíduos aqui identificados sejam parte importante do inóculo inicial do solo. Um grande número de espécies de *Fusarium* tem sido encontrado associado com podridão de raízes em soja (*Fusarium Root Rot* – FRR), sendo *Fusarium solani* e *F. oxysporum* as mais frequentes. Além dessas, espécies como *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* O'Donnell & T. Aoki, *F. proliferatum*, *F. semitectum* Berk. & Ravenel, *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. culmorum*, *F. equiseti* (Corda) Sacc., entre outras, também vêm sendo relacionadas à FRR (MALVICK, 2010).

A espécie *Fusarium proliferatum* é cosmopolita e causa doenças em culturas de importância agrônômica tais como milho (LOGRIECO et al., 1995) e arroz (DESJARDINS et al., 1997) e já existem registros de sua associação com alho e cebola (STANKOVIC et al.,

2007). A presença dessa espécie no solo, da área onde as amostras foram coletadas, pode ser atribuída a sua sobrevivência em restos culturais, pois conforme as informações fornecidas na Tabela 1 foi cultivado milho no local durante o verão de 2007/08.

Comparando-se a compactação do solo (R_p , MPa) e as espécies encontradas neste estudo (Tabela 7), pode-se observar que *F. proliferatum* e *F. oxysporum* ocorreram tanto nos pontos de coleta em que o solo estava mais compactado (5,0 e 4,6 MPa) quanto em um grau de compactação intermediário (3,4 MPa), que pode ter favorecido seu desenvolvimento. *F. graminearum* também foi encontrado em amostras de solo com essa R_p , embora essa espécie também tenha sido observada em condições de solo menos compactado (1,3 e 2,2 MPa), assim como *F. avenaceum* (0,3 MPa).

Tabela 7 – Origem, características culturais e morfológicas de *Fusarium* spp. obtidos de amostras provenientes de três profundidades no perfil do solo em áreas com diferentes níveis de compactação. Santa Maria, RS, 2010.

Isolado	Ponto ^a e profundidade de coleta (cm)	Rp (MPa) ^b	Pigmentação	Macroconídios			Microconídios	Clamid. ^c	Diâmetro colônia (mm)	Afinidade morfológica
				Comprimento (µm)	Largura (µm)	Número de septos				
F1s ^d	P 26 10-15	3,4	Roxo amarronzado	27,0	2,7	2,9	+ ^e / FC ^f	+	69,1	<i>F. oxysporum</i>
F2s	P 26 05-10	3,4	Creme claro	29,6	2,5	2,8	+/- FC; cadeias	+	54,0	<i>F. proliferatum</i>
F3s	P 29 10-15	5,0	Lilás claro	25,6	2,9	2,9	+/- FC	+	75,0	<i>F. oxysporum</i>
F4s	P 29 10-15	5,0	Roxo escuro	27,2	2,5	3,0	+/- FC	+	70,0	<i>F. oxysporum</i>
F5s	P 21 10-15	4,6	Creme claro	34,0	2,7	3,5	+/- FC; cadeias	+	65,0	<i>F. proliferatum</i>
F6s	P 133 00-05	0,3	Ocre bronzeado	66,0	2,5	5,2	-	-	57,0	<i>F. avenaceum</i>
F7s	P 133 05-10	0,3	Ocre bronzeado	67,1	2,7	4,9	-	-	71,0	<i>F. avenaceum</i>
F8s	P 21 00-05	4,6	Creme claro	36,0	3,0	3,1	+/- FC	+	75,0	<i>F. solani</i>
F9s	P 91 00-05	1,3	Avermelhado claro	33,8	2,5	3,0	-	+	74,3	<i>F. graminearum</i>
F10s	P 54 00-05	2,2	Vermelho carmim	47,9	4,8	4,2	-	+	75,2	<i>F. graminearum</i>
F11s	P 29 00-05	5,0	Creme rosado	34,0	3,1	3,0	-	+	74,0	<i>F. graminearum</i>
F12s	P 29 10-15	5,0	Violeta escuro	36,7	2,5	3,1	+/- FC	+	68,0	<i>F. oxysporum</i>
F13s	P 26 05-10	3,4	Creme arroxeadado	37,0	2,8	3,2	+/- FC; cadeias	+	67,0	<i>F. proliferatum</i>

^a Ponto marcado através de GPS. ^b Rp: Resistência à penetração (MPa) é considerada uma das medidas indiretas do nível de compactação de um solo. ^c Clamidósporos.

^d isolados obtidos de solo. ^e Presença ou ausência da estrutura. ^f Microconídios em falsas cabeças.

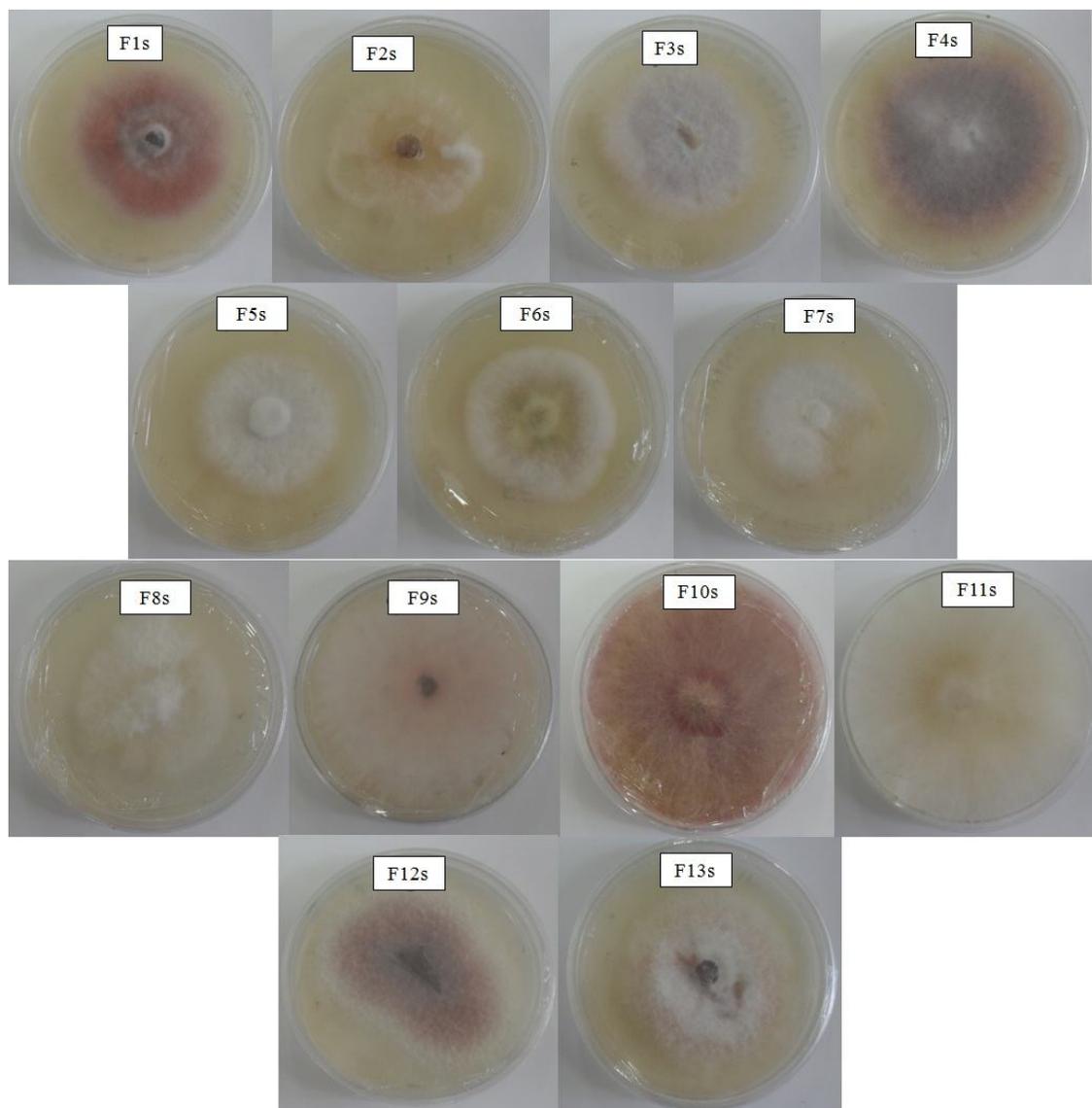


Figura 9 – Isolados de *Fusarium* spp. (face superior) identificados através de características morfológicas e marcadores moleculares. F1s (*F. oxysporum*); F2s (*F. proliferatum*); F3s (*F. oxysporum*); F4s (*F. oxysporum*); F5s (*F. proliferatum*); F6s (*F. avenaceum*); F7s (*F. avenaceum*); F8s (*F. solani*); F9s (*F. graminearum*); F10s (*F. graminearum*); F11s (*F. graminearum*); F12s (*F. oxysporum*); e F13s (*F. proliferatum*). Santa Maria, 2011.

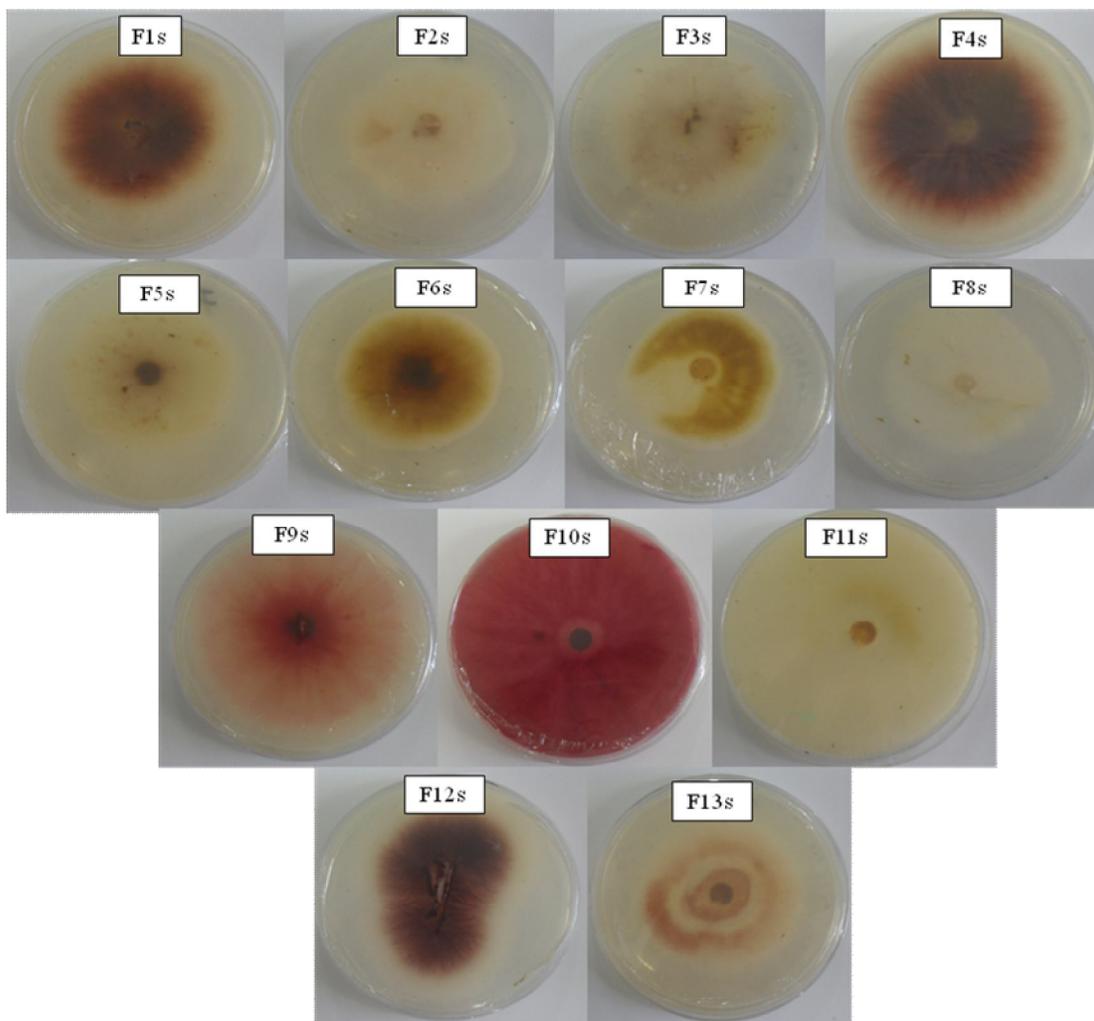


Figura 10 – Isolados de *Fusarium* spp. (face inferior) identificados através de características morfológicas e marcadores moleculares. F1s (*F. oxysporum*); F2s (*F. proliferatum*); F3s (*F. oxysporum*); F4s (*F. oxysporum*); F5s (*F. proliferatum*); F6s (*F. avenaceum*); F7s (*F. avenaceum*); F8s (*F. solani*); F9s (*F. graminearum*); F10s (*F. graminearum*); F11s (*F. graminearum*); F12s (*F. oxysporum*); e F13s (*F. proliferatum*). Santa Maria, 2011.

Não houve divergência entre a identificação de espécies baseada em caracteres morfológicos e com marcador molecular (região TEF-1 α). Como as sequências apresentaram, em média, 1100 pb observou-se que as demais existentes no *GenBank* eram menores (entre 700 e 900 pb), gerando uma baixa cobertura nos resultados de pesquisa na base de dados, embora o percentual de similaridade ficasse em torno de 90%. Em função disso, realizou-se o corte das sequências no programa BioEdit, o que as deixou com um comprimento mais semelhante com aquelas sequências do *GenBank*. Após o corte, verificou-se uma melhoria

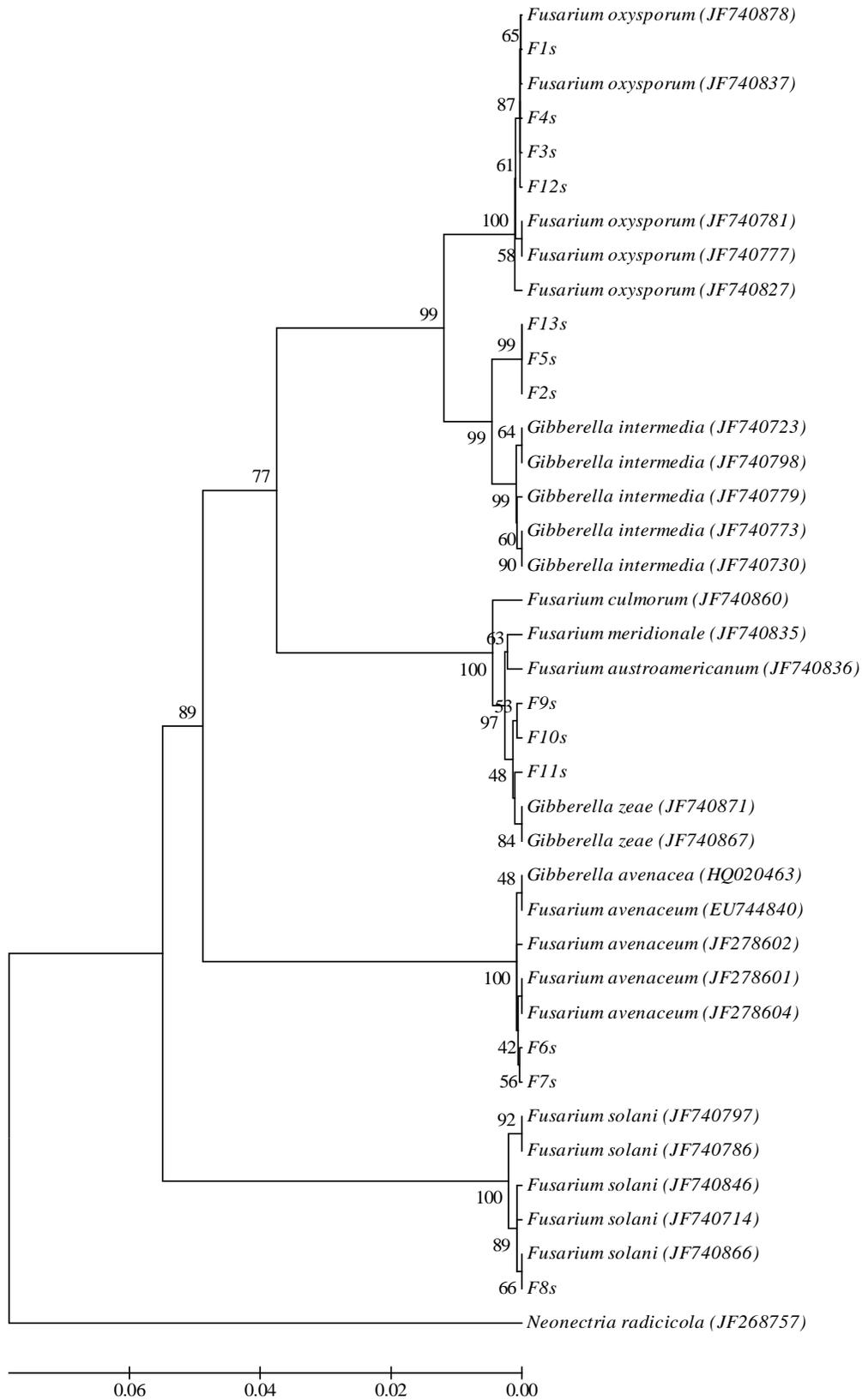
nos valores de cobertura e similaridade (%) e, conseqüentemente, uma melhor sincronia entre as sequências utilizadas para a confecção do dendrograma (Figura 11).

Para os isolados F1s, F3s, F4s e F12s o valor de *bootstrap* se estendeu de 61 até 100 com as sequências de *Fusarium oxysporum* obtidas no *GenBank*. Esses valores confirmariam a identidade dos isolados. O grupo formado pelos isolados F2s, F5s e F13s apresentou um *bootstrap* de alto suporte com sequências de *Gibberella intermedia* (anamorfo: *Fusarium proliferatum*). Pode-se observar que esses isolados formaram um grupo a parte dentro do grande grupo (com *bootstrap* igual a 99), o que poderia ser um indicativo de que eles são diferentes das demais sequências disponíveis no *GenBank*. O mesmo foi observado para os isolados F6s e F7s (*F. avenaceum*) e F9s, F10s e F11s (*F. graminearum*), que formaram grupos diferenciados das outras sequências com os quais foram comparados.

O alinhamento da região TEF-1 α também possibilitou classificar o isolado F8s no mesmo grupo que outras sequências de *Fusarium solani*, com um suporte de *bootstrap* que variou de intermediário a alto.

Sequências da região TEF-1 α têm sido utilizadas para distinção de espécies de *Fusarium* e, em alguns casos, corroboram o *design* de primers para regiões específicas do genoma desses fungos (DITA et al., 2010). Além disso, o TEF-1 α é empregado com sucesso em estudos que envolvam filogenia (O'DONNELL et al., 1998). Entretanto, regiões genômicas, como o IGS, quando combinadas com outras técnicas moleculares (RFLP, por exemplo), resultam em uma maior discriminação de espécies do que TEF-1 α . Isso já foi comprovado para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis* W.C. Snyder & H.N. Hansen (FOURIE et al., 2009).

Utilizando sequências TEF-1 α , Kristensen et al. (2005) conseguiram correlacionar espécies de *Fusarium* com potencial toxicogênico, tais como *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum* (Corda) Sacc. e *F. venenatum* Nirenberg 1995. Também através dessas sequências, os autores puderam realizar a análise filogenética de tais espécies, compilando as informações, gerando uma análise de filotoxigenia que poderia ter implicações diretas sobre uma melhor classificação de *Fusarium*. Análises de sequências TEF-1 α também revelaram variabilidade suficiente para diferenciação de espécies de *Fusarium* isoladas de beterraba açucareira (NITSCHKE et al., 2009).



Continua...

Figura 11 – Dendograma baseado no método “*Neighbor-joining*” derivado das sequências da região TEF-1 α , com base em 5000 réplicas de “*bootstrap*”, dos isolados de *Fusarium* spp.: F1s, F3s, F4s e F12s: *F. oxysporum*; F2s, F5s e F13s: *F. proliferatum*; F6s e F7s: *F. avenaceum*; F8s: *F. solani*; F9s, F10s e F11s: *F. graminearum*, e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Fusarium* spp. O número nas ramificações representa o valor de “*bootstrap*”. *Neonectria radicicola* (JF268757) foi utilizado como *outgroup*. Santa Maria, 2012.

4.4. Caracterização molecular de *Trichoderma* spp.

Houve variação no comprimento das regiões ITS 1 e ITS 4 dos isolados de *Trichoderma* spp. sequenciados, sendo que estas ficaram entre 570 e 588 pb. Os isolados T1s e T3s foram agrupados no mesmo clado que a espécie *Trichoderma koningiopsis* (Clado Viride) com um suporte de *bootstrap* entre 66 e 86 (Figura 12). Os isolados T2s e T4s foram alinhados com outras sequências de *Trichoderma tomentosum* Bissett e, por isso, foram agrupados no Clado Harzianum. O suporte de *bootstrap* para esses isolados foi entre 59 e 91. O isolado T5s foi agrupado com *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Clado Hamatum), embora o *bootstrap* tenha sido intermediário.

As duas espécies mais evidentes entre os isolados do antagonista foram *T. koningiopsis* e *T. tomentosum* (Figura 13). A espécie *T. koningiopsis* também foi observada por Menezes et al. (2010) em um estudo envolvendo três isolados do antagonista, advindos de crisântemo, que foram submetidos a PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS2 e posterior digestão enzimática com enzimas de restrição. Os autores concluíram que o sequenciamento da região ITS rDNA foi satisfatória para a diferenciação dos isolados de *Trichoderma* spp., ao contrário das enzimas de restrição que não foram eficientes na geração de fragmentos para distingui-los.

É possível que isolados de *T. koningiopsis* induzam a produção de enzimas quitinolíticas e endoglucanases em células do sistema radicular do hospedeiro. Essa espécie, apesar de ser considerada cosmopolita, é mais comum em latitudes de clima tropical do que clima temperado. *T. koningiopsis* tem sido isolado como endofítico em *Theobroma* spp. (cacaueiro) e constitui uma espécie agregada a *T. koningii*, com potencial para o controle biológico de diversos patógenos (SAMUELS et al., 2006). Assim como outras espécies de

Trichoderma, *T. koningii* beneficia a sanidade da planta e pode atuar na biomineralização de cristais de cálcio no solo (OYARBIDE et al., 2001).

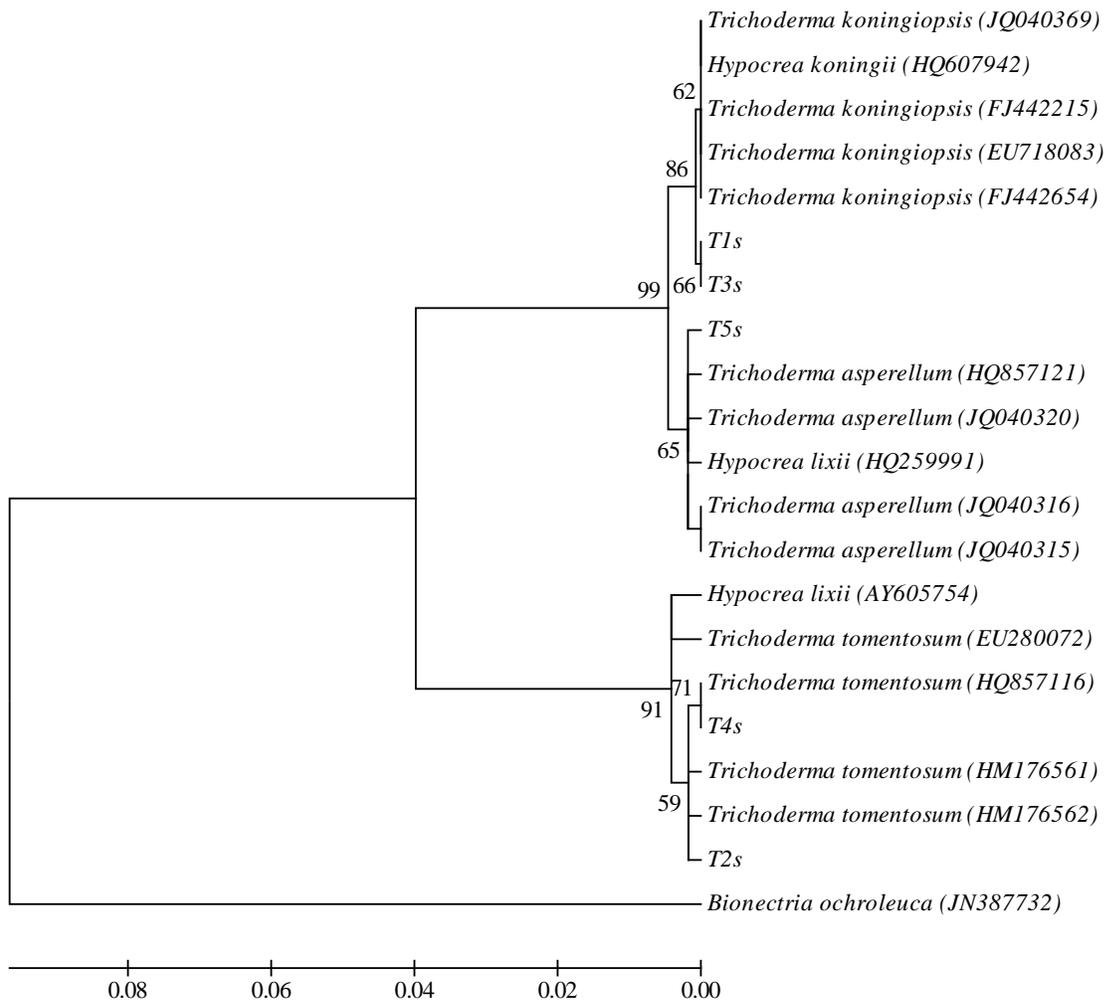


Figura 12 – Dendrograma baseado no método de Máxima Verossimilhança derivado das seqüências das regiões ITSrDNA 1 e 4, com base em 5000 réplicas de “bootstrap”, de isolados de *Trichoderma* spp.: T1s e T3s: *T. koningiopsis*; T2s e T4s: *T. tomentosum*; e T5s: *T. asperellum*, e de seqüências obtidas no GenBank de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”. *Bionectria ochroleuca* (JN387732) foi utilizado como *outgroup*. Santa Maria, 2012.

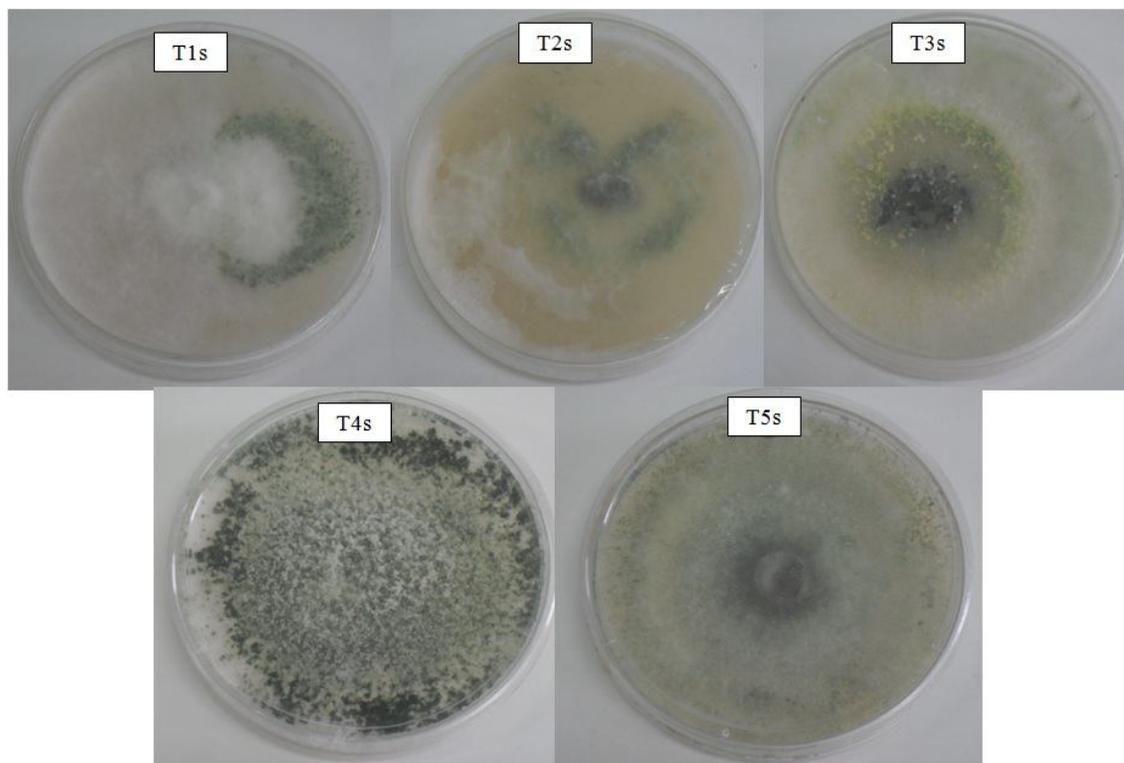


Figura 13 – Isolados de *Trichoderma* spp. identificados através de marcadores moleculares ITS. T1s e T3s: *T. koningiopsis*; T2s e T4s: *T. tomentosum*; e T5s: *T. asperellum*. Santa Maria, 2011.

Existem traços evolutivos que indicam uma proximidade genética entre *T. tomentosum* e *T. harzianum* e nisto, a possibilidade de um intercâmbio genético entre essas espécies (HOYOS-CARVAJAL et al., 2009). Nesses casos, o sequenciamento da região ITS não seria eficiente para distinção de espécies que são muito proximamente relacionadas (DRUZHININA et al., 2006). Foi verificado que *T. tomentosum* incrementou, em casa de vegetação, a área foliar e o peso seco de parte aérea e raiz em plantas de repolho que receberam suspensão de conídios do antagonista (RABEENDRAN et al., 2000). Esse fato poderia ser explicado em função da proximidade genética entre *T. harzianum* Rifai, que é tradicionalmente conhecido como promotor de crescimento, e *T. tomentosum*.

Com relação ao isolado T5s identificado como *T. asperellum* (Figura 13), o isolado utilizado neste estudo faz parte da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da UFSM e havia sido obtido de solo rizosférico de tomateiro cultivado em estufa (ETSR 20). Conforme Ethur (2005), esse isolado foi selecionado com base em sua eficiência de controle para *Fusarium solani* e *F. oxysporum* “*in vitro*”. Da mesma forma, Lucon et al. (2009) em

uma avaliação envolvendo várias espécies do antagonista e, entre elas, *T. asperellum*, observaram que a mesma teve grande eficiência no controle de murcha em pepineiro, causada por *Rhizoctonia solani*, em condições de casa de vegetação. Os autores utilizaram o sequenciamento da região ITS para definição das espécies do antagonista. Ainda, *Trichoderma asperellum* foi constatada como uma das espécies mais recorrentes na biodiversidade da Colômbia o que poderia ser explicado pela sua grande variabilidade genética e à capacidade de colonizar diferentes hospedeiros e substratos à base de carbono (HOYOS-CARVAJAL et al., 2009).

4.5 Seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. com antagonismo à *Fusarium* spp. em soja

A Tabela 8 apresenta os valores médios de crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. em confrontação direta e a classificação do antagonismo de *Trichoderma* spp. Os isolados de *Fusarium* spp. F1s (*F. oxysporum*), independentemente do isolado de *Trichoderma* spp. utilizado, e F2s (*F. proliferatum*), exceto quando em combinação com o isolado de *Trichoderma* spp. T1s (*T. koningiopsis*) foram os que apresentaram os menores valores médios de crescimento micelial aos sete dias de avaliação. Para F3s (*F. oxysporum*) não houve redução significativa do crescimento e em F4s (*F. oxysporum*) pode-se observar uma pequena redução que foi dependente do isolado de *Trichoderma* spp. com que foi confrontado.

Com relação à classificação do antagonismo de *Trichoderma* spp., os isolados T2s e T4s, ambos identificados como *T. tomentosum*, foram agrupados na classe 1, sendo capazes de crescer sobre todo o patógeno. Tal classificação aplicou-se aos isolados de *Fusarium* sp. F3s e F4s, identificados como *F. oxysporum*. Entretanto, foi observado que o isolado T4s, quando confrontado com F1s (*F. oxysporum*) e F2s (*F. proliferatum*) apresentou uma classificação muito próxima a 1 (1,2 e 1,3, respectivamente), o que o torna bastante eficiente.

Tabela 8 – Crescimento micelial de *Fusarium* spp. após sete dias em teste de confrontação direta com *Trichoderma* spp. e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme escala de Bell et al. (1982) após 13 dias de incubação. Santa Maria, RS, 2010.

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

⁽¹⁾Isolados de *Trichoderma* spp. e respectivas espécies, Rp e profundidades de coleta no perfil do solo: T1s: *T. koningiopsis*; 3,4 MPa/00-05 cm; T2s: *T. tomentosum*; 3,4 MPa/05-10 cm; T3s: *T. koningiopsis*; 3,4 MPa/10-15 cm; T4s: *T. tomentosum*; 5MPa/05-10 cm; e T5s: *T. asperellum*; ETSR 20. ⁽²⁾Isolados de *Fusarium* spp. e respectivas espécies, Rp e profundidades de coleta no perfil do solo: F1s: *F. oxysporum*; 3,4 MPa/0-15 cm; F2s: *F. proliferatum*; 3,4 MPa/5-10 cm; F3s: *F. oxysporum*; 5MPa/10-15 cm; e F4s: *F. oxysporum*; 5MPa/10-15 cm. ⁽³⁾Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$); ^(ns)não significativo. ⁽⁴⁾Classe 1: *Trichoderma* spp. cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* spp. cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* spp. ocupa aproximadamente a metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* spp. cresce sobre 1/3 do meio; e Classe 5: *Trichoderma* spp. não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa (Adaptado de Carvalho et al., 2011). ⁽⁵⁾Média geral do crescimento micelial de *Fusarium* sp. e das classes de antagonismo de *Trichoderma* spp. ⁽⁶⁾Coefficiente de variação (%).

Esses resultados contrariam os observados por Lopes et al. (2012) em que o isolado de *T. tomentosum* 29/11, entre outros avaliados em confrontação direta com *Sclerotinia*

sclerotiorum, obteve um score muito baixo entre as classes de antagonismo de Bell. Ainda, com relação à produção de metabólitos voláteis, os autores observaram que os isolados de *T. tomentosum* 364/02 e 476/02 e *T. asperellum* 400/01, inibiram insatisfatoriamente o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

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

Os demais isolados (T1s, T3s e T5s) apresentaram bom potencial de antagonismo contra *Fusarium* spp., sendo agrupados dentro da classe 2, embora para F1s o isolado T3s tenha ficado dentro da classe 1 (1,2). A comparação entre o crescimento micelial de *Fusarium* spp. em combinação com *Trichoderma* spp. e a testemunha (somente *Fusarium* spp.) é apresentada na Figura 14.

Os isolados F3s, F4s e F2s diferenciaram-se de F1s por terem maior crescimento micelial (Figura 14). Entretanto, o isolado F1s não diferiu estatisticamente de tratamentos em que *Fusarium* spp. foi combinado com *Trichoderma* spp. (F4s x T1s, F3s x T1s e F2s x T1s). Além disso, os tratamentos com o isolado F1s em combinação com todos isolados de *Trichoderma* spp. testados tiveram os menores crescimentos, assim como as combinações F2s x T2s, F2s x T3s e F2s x T4s. Tais resultados apontam que *in vitro* F1s (*F. oxysporum*) e F2s (*F. proliferatum*) seriam mais facilmente controlados pelos possíveis antagonistas testados.

Entre os principais mecanismos envolvidos em testes de biocontrole (como o de confrontação direta) em que *Trichoderma* spp. é utilizado, destacam-se o micoparasitismo (PAPAVIZAS, 1985; HARMAN; KUBICEK, 1998; HOWELL, 2003) e a antibiose (HOWELL, 1998; SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998). Além disso, acredita-se que fungos do gênero *Trichoderma* são hábeis na produção e liberação de enzimas hidrolíticas o que os auxilia na detecção da presença de outro fungo pela sensibilidade de moléculas liberadas a partir do hospedeiro (planta) por degradação enzimática (VINALE et al., 2008).

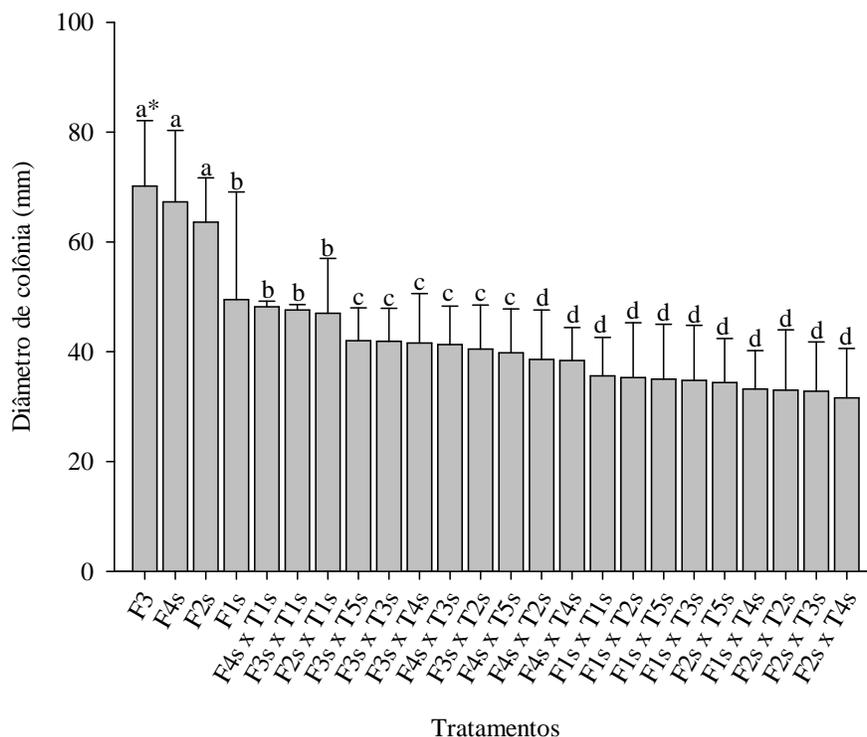


Figura 14 – Crescimento micelial de isolados de *Fusarium* spp. utilizados no experimento de biocontrole em soja, após sete dias, em cultivo individual e em teste de confrontação direta com isolados de *Trichoderma* spp. Santa Maria, RS, 2011. F1s, F3s e F4s (*F. oxysporum*); F2s (*F. proliferatum*); T1s e T3s (*T. koningiopsis*); T2s e T4s (*T. tomentosum*); e T5s (*T. asperellum*). * Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o desvio padrão.

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

Os resultados de alguns tratamentos não foram apresentados nos gráficos em função da elevada incidência de “*damping-off*”, que foi quantificada em porcentagem (%) (Tabela 9) e, na Figura 15, a colonização do substrato pelo fungo e a manifestação dos sintomas em plântulas de soja.

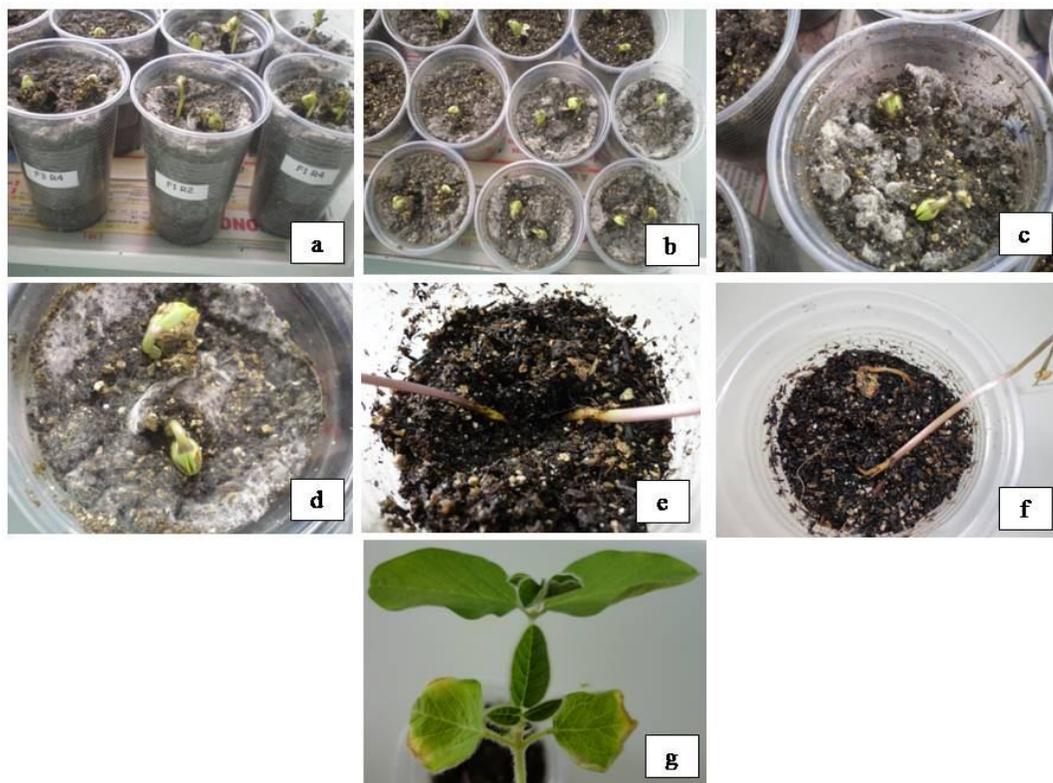


Figura 15 –Aspecto do substrato infestado com isolados de *Fusarium* sp., após 12 dias, e soja germinando após três dias de semeadura. a) Tratamentos contendo apenas *Fusarium* sp. e micélio do fungo cobrindo o substrato; b, c e d) detalhe do substrato infestado por *Fusarium* sp; e) sintoma de *damping off* em plântulas de soja; f) evolução do sintoma de *damping off* com morte de plântulas; e g) clorose e necrose nas bordas dos folíolos de uma plântula no início da manifestação de *damping off* em comparação com a Testemunha. Santa Maria, RS, 2011.

O tratamento F1s (*F. oxysporum*), isolado ou combinado com *Trichoderma* spp. (F1s x T2s e F1s x T5s) foi o mais agressivo, obtendo 100% de tombamento de plântulas. Além disso, F1s x T3s e F1s x T4s também tiveram grande incidência de doença, assim como F4s x T1s e F4s x T3s, todos com 75% de tombamento. Em comparação aos resultados obtidos no teste de confrontação direta *in vitro*, foi possível destacar algumas diferenças. A combinação F2s x T1s, que obteve um dos maiores crescimentos miceliais (Tabela 8 e Figura 14), foi uma das que apresentou resultados negativos *in vivo*, pois teve baixas médias de comprimento de raiz (cm) e peso fresco e seco (g) (Figura 16). O isolado F2s (*F. proliferatum*) prejudicou bastante o desenvolvimento de plântulas, o que pode ser comprovado por sua recorrência entre os piores tratamentos *in vivo*.

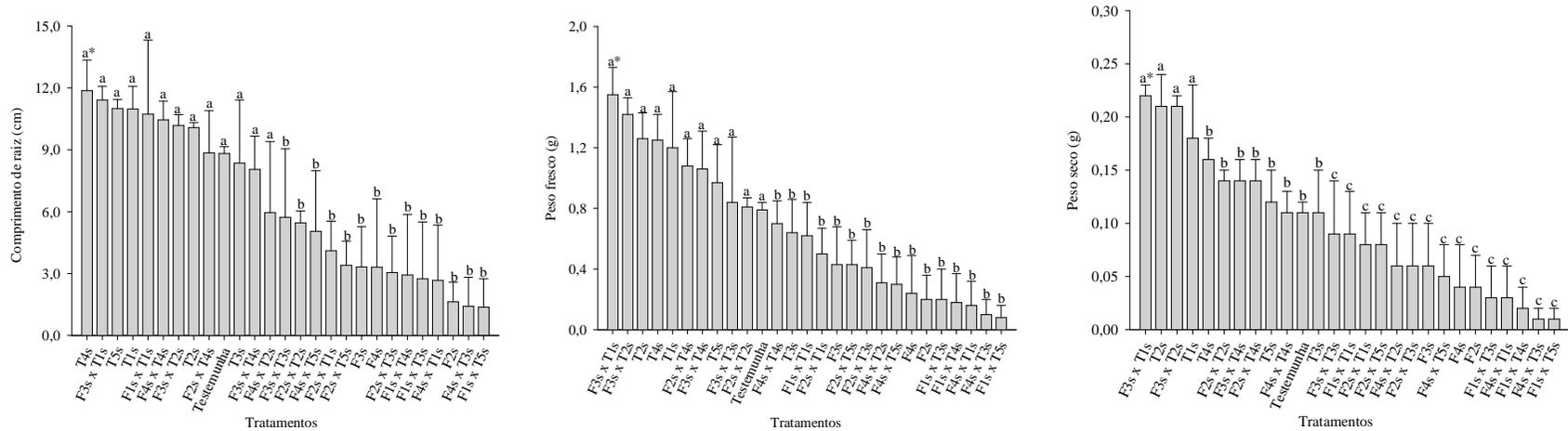


Figura 16 – Comprimento de raiz (cm), peso fresco (g) e peso seco (g) de plântulas de soja, cultivar FT-Estrela, aos 30 dias após semeadura (DAS) em substrato infestado com isolados de *Fusarium* sp. e *Trichoderma* spp. de forma isolada ou combinada. Isolados de *Fusarium* spp.: F1s: *F. oxysporum*; F2s: *F. proliferatum*; F3s: *F. oxysporum*; F4s: *F. oxysporum*. Isolados de *Trichoderma* spp.: T1s: *T. koningiopsis*; T2s: *T. tomentosum*; T3s: *T. koningiopsis*; T4s: *T. tomentosum*; T5s: *T. asperellum*. Santa Maria, RS, 2011. *Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o desvio padrão.

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

Não houve tombamento de plântulas nos tratamentos Testemunha, com *Trichoderma* spp. de forma isolada e para os isolados de *Fusarium* sp. F2s e F3s de forma isolada (Tabela 9). Além disso, não foi observado tombamento em algumas combinações entre esses isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp., tais como F3s combinado com T1s, T2s, T3s e T4s e para o tratamento F4s x T4s.

Tabela 9 –Tombamento (%) de plântulas de soja, cultivar FT-Estrela, após 30 dias de cultivo em substrato infestado com isolados de *Fusarium* spp. (F) e *Trichoderma* spp. (T), de forma isolada ou combinada. Santa Maria, RS, 2011.

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

⁽¹⁾Isolados de *Fusarium* spp.: F1s, F3s e F4s: *F. oxysporum*; F2s: *F. proliferatum*. Isolados de *Trichoderma* spp.: T1s e T3s: *T. koningiopsis*; T2s e T4s: *T. tomentosum*; T5s: *T. asperellum*. Testemunha: apenas água estéril, sem *Fusarium* spp. e sem *Trichoderma* spp.

Com relação à *Trichoderma* spp., os melhores isolados *in vitro* (T2s e T4s) também foram responsáveis por alguns dos resultados mais promissores *in vivo*. Além deles, T1s e T5s, agrupados na classe 2 de antagonismo, obtiveram destaque para a variável comprimento de raiz (Figura 16). Ainda, o isolado T3s (classe 2 de antagonismo) não foi um dos melhores tratamentos *in vivo*, embora tenha sido eficiente *in vitro* contra o isolado F1s de *Fusarium* sp.

Não foi observado tombamento para as combinações entre o isolado F3s e T1s, T2s, T3s e T4s, tendo esse último se destacado, pois quando combinado com F2s e F4s, não houve incidência da doença (Tabela 9). Combinações envolvendo o tratamento T5s (F1s x T5s e F3s

x T5s; F2xT5; e F4xT5) apresentaram 100, 50 e 25% de tombamento de plântulas, respectivamente.

Nos tratamentos em que se realizou a avaliação em plântulas, foi possível observar que embora os isolados de *Trichoderma* spp. tivessem sido aplicados de maneira isolada, algumas combinações entre o antagonista e o patógeno foram capazes de promover um melhor desenvolvimento de plântula. Para a variável comprimento de raiz (cm) (Figura 16), por exemplo, os únicos tratamentos combinados que induziram redução de crescimento radicular foram F2s x T2s, F2s x T1s e F2s x T5s. Os demais não diferiram estatisticamente entre si. Os tratamentos que se destacaram para comprimento de raiz foram T4s, F3s x T1s, T5s, T1s, F1s x T1s, F4s x T4s, F3s x T2s e T2s em que as médias ficaram acima de 10 cm.

Para o peso fresco de plântulas (Figura 16), os tratamentos F3s x T1s, F3s x T2s e T2s tiveram as melhores médias, acima de 1,2 g, e os tratamentos F4s, F2s, F1s x T3s, F1x T4s, F4s x T1s, F4s x T3s e F1s x T5s foram os que apresentaram as menores médias. O isolado de *Fusarium* sp. F2s, mesmo em combinação com *Trichoderma* spp. (T1s e T5s) foi capaz de prejudicar o desenvolvimento de plântulas. Esse resultado pode ser justificado por possíveis relações antagônicas entre os metabólitos produzidos por ambos os fungos e isso se refletiu sobre o peso fresco das plântulas tratadas com tais micro-organismos. Em estudo conduzido com maracujazeiro e isolados de *Trichoderma* spp. avaliando o enraizamento de estacas, Santos et al. (2010) verificaram que os isolados utilizados não promoveram o enraizamento, embora *Trichoderma* spp. tenha incrementado o peso fresco e seco de plantas advindas das estacas.

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

4.7 Seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. com antagonismo à *Fusarium graminearum* em aveia preta

Foram testados dois isolados de *F. graminearum* contra os mesmos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos testes de biocontrole *in vitro* para a soja. As médias de crescimento micelial e classificação do antagonismo de *F. graminearum* e *Trichoderma* spp., respectivamente, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Crescimento micelial de isolados de *Fusarium graminearum* após sete dias em teste de confrontação direta com isolados de *Trichoderma* spp. e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme escala de Bell et al. (1982) após 13 dias de incubação. Santa Maria, RS, 2012.

<i>Trichoderma</i> sp. ⁽¹⁾	<i>Fusarium graminearum</i> ⁽²⁾	Diâmetro médio das colônias de isolados de <i>Fusarium</i> sp. (mm) ⁽³⁾	Classificação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. ⁽⁴⁾
T1s		34,8 ^(ns)	1,8 a
T4s		32,3	1,6 a
T2s	F10s	33,1	1,4 ab
T5s		33,0	1,0 b
T3s		30,5	1,0 b
T2s		39,9 ^(ns)	3,0 a
T4s		39,1	3,0 a
T3s	F11s	38,5	2,0 b
T5s		36,5	2,0 b
T1s		40,9	1,6 b
Média ⁽⁵⁾		35,87	1,84
C.V. (%) ⁽⁶⁾		10,63	18,03

⁽¹⁾ Isolados de *Trichoderma* spp. e respectivas espécies, pontos e profundidades de coleta no perfil do solo: T1s: *T. koningiopsis*; 3,4 MPa/00-05 cm; T2s: *T. tomentosum*; 3,4 MPa/05-10 cm; T3s: *T. koningiopsis*; 3,4 MPa/10-15 cm; T4s: *T. tomentosum*; 5MPa/05-10 cm; e T5s: *T. asperellum*; ETSR 20. ⁽²⁾ Isolados de *Fusarium graminearum*, Rp e profundidades de coleta no perfil do solo: F10s (5,0 Mpa/5-10 cm); F11s (2,2MPa/0-5 cm).

⁽³⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$);

^(ns) não significativo. ⁽⁴⁾ Classe 1: *Trichoderma* spp. cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio;

Classe 2: *Trichoderma* spp. cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* spp. ocupa aproximadamente a metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* spp. cresce sobre 1/3 do meio; e

Classe 5: *Trichoderma* spp. não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa (Adaptado de Carvalho et al., 2011).

⁽⁵⁾ Média geral do crescimento micelial de *Fusarium* sp. e das classes de antagonismo de *Trichoderma* spp. ⁽⁶⁾ Coeficiente de variação (%).

⁽⁶⁾ Coeficiente de variação (%).

Com relação ao diâmetro médio de colônias de *F. graminearum*, não houve diferença estatística para ambos os isolados, F10s e F11s, independentemente do isolado de *Trichoderma* spp. com que foram confrontados. Porém, pode-se observar que uma melhor

classificação do antagonista ocorreu nos confrontos com o isolado F10s sendo que os isolados T3s, T5s e T2s foram enquadrados na classe 1 de antagonismo. Além desses, os isolados T4s (1,6) e T1s (1,8) também podem ser considerados agentes de controle biológico promissores, pois apresentaram classes de antagonismo próximas a 2.

Os tratamentos F11s x T1s (classe 1,6), F11s x T5s e F11s x T3s (classe 2,0) se destacaram quanto à classificação de antagonismo, já que T4s e T2s tiveram notas que os agruparam junto a classe 3. Embora um antagonista não tenha conseguido expressar sua máxima eficiência com relação ao patógeno em um teste *in vitro*, não significa necessariamente que o mesmo apresentará o mesmo comportamento em um teste *in vivo*, pois nessas condições a interação solo-planta aliada a fatores ambientais determinará o sucesso ou o fracasso de um agente de controle biológico.

As relações antagônicas podem ser de competição, predação, amensalismo, parasitismo, resistência induzida e produção de metabólitos que irão inibir o crescimento e desenvolvimento do fitopatógeno. Dentre esses, o parasitismo é citado como o mecanismo de controle biológico mais eficiente em que os antagonistas estabelecem uma relação de dependência com seus hospedeiros, implicando em sua sobrevivência e, muitas vezes, tal relação pode ser favorecida ou não pelas condições ambientais e suas variações (GRIGOLETTI et al., 2000).

4.8 Teste *in vivo* de isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium graminearum* em plântulas de aveia preta

Em aveia preta, os resultados obtidos não foram tão expressivos quanto os da soja, pois não houve manifestação de “*damping-off*” (tombamento de plântulas) aos 30 Dias Após a Semeadura (DAS). Entretanto, pode-se observar que os tratamentos Testemunha, T4s, T2s e F11xT1 apresentaram maiores comprimentos de raiz (cm) em relação aos demais. Ainda para essa variável o pior resultado ocorreu no tratamento F10s x T5s (Figura 17) que, com exceção dos melhores tratamentos, não diferiu estatisticamente dos demais. Para o peso fresco de plântulas, os isolados T4s, T2s e T5s proporcionaram as melhores médias, embora não tenham diferido da Testemunha (Figura 17).

Ainda, com relação ao peso fresco de plântulas observou-se que os demais isolados de *Trichoderma* spp. não foram capazes de proporcionar incremento e também não houve

diferença estatística entre os mesmos. Avaliando 19 isolados de *Trichoderma* spp. e sua atividade antagonista à *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis & Halst., Silva et al. (2011) constataram que os isolados IB 01/03, IB 15/06, IB 31/06 e IB 34/08 proporcionaram os maiores índices de matéria seca em dois dos três experimentos realizados em diferentes épocas do ano. Os autores associaram essa variação no efeito dos isolados de *Trichoderma* spp. à diferenças existentes entre tais épocas. Com isso, comprovou-se que a temperatura e a umidade relativa do solo seriam os principais efeitos que podem interferir no bom desempenho de um agente de biocontrole de doenças em plantas (AKRAMI et al., 2011).

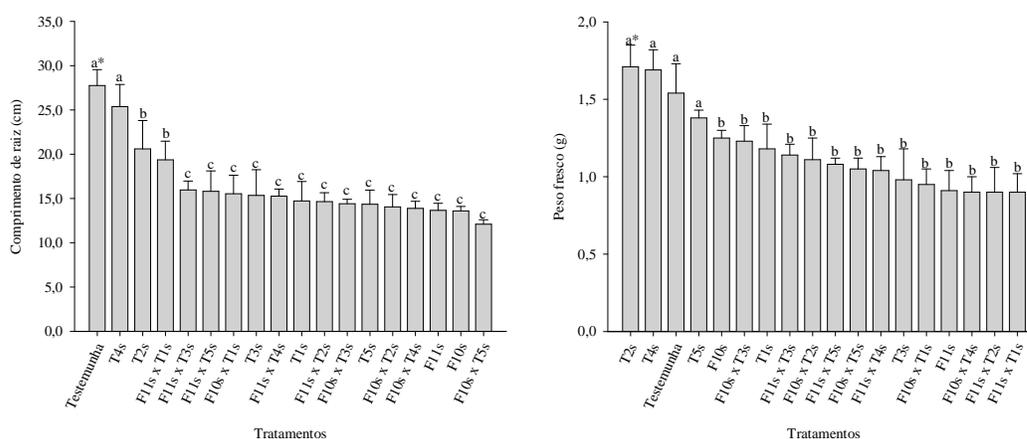


Figura 17 – Comprimento de raiz (cm) e peso fresco (g) de plântulas de aveia preta, cultivar Comum, aos 30 dias após semeadura (DAS) em substrato infestado com isolados de *Fusarium graminearum* e *Trichoderma* spp. de forma isolada ou combinada. Isolados de *F. graminearum*: F10s e F11s. Isolados de *Trichoderma* spp.: T1s: *T. koningiopsis*; T2s: *T. tomentosum*; T3s: *T. koningiopsis*; T4s: *T. tomentosum*; T5s: *T. asperellum*. Santa Maria, RS, 2011. * Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o desvio padrão.

Como o presente experimento foi realizado entre o final de fevereiro e o início de abril de 2012, é provável que alguns dias de temperatura (°C) mais elevada e umidade relativa do ar mais baixa tenham interferido no pleno estabelecimento de *Trichoderma* spp. no substrato infestado. Além disso, essas condições ambientais mais desfavoráveis aos fungos utilizados na infestação de substrato, também explicariam a não ocorrência de *damping off* em plântulas de aveia preta.

4.9 Detecção e quantificação de zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) em isolados de *Fusarium* spp. obtidos de solo com diferentes níveis de compactação

No teste de fluorimetria para detecção de ZEA, os isolados F1s (*F. proliferatum*), F3s (*F. oxysporum*), F8s (*F. solani*) e F9s, F10s e F11s (*F. graminearum*) obtiveram destaque, produzindo quantidades mais elevadas dessa micotoxina (Tabela 11). Produzida por diferentes espécies de *Fusarium*, a zearalenona possui efeito estrogênico sobre os animais domésticos (HAGLER et al., 1979) e sua produção é favorecida por condições ambientais mais amenas e com alta umidade (WEAVER et al., 1986). De modo geral, os isolados acima listados, advindos de condições de solo com maior compactação (Tabela 11), poderiam ter encontrado, ainda no solo, condições mais adequadas para a expressão dos *clusters* de genes que coordenam a produção dessa micotoxina, sendo o isolado de *F. graminearum* F11s produtor de zearalenona. Em grãos, a produção de ZEA ocorre em seu estágio de desenvolvimento sendo que a infecção por *Fusarium* acontece sob condições de elevada pluviosidade e períodos de alternância entre baixas (~ 14 °C) e altas (~ 28 °C) temperaturas.

Tabela 11 – Quantidades de zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) obtidas a partir de isolados de *Fusarium* sp. oriundos de solo cultivado com soja/aveia preta sob sistema plantio direto. Santa Maria, RS, 2012.

Isolados ^(a)	Rp (MPa) ^(b)	Espécie	ZEA (ppm) ^(c)	DON (ppm)
F3s	5,0	<i>Fusarium oxysporum</i>	12,0	- ^{*nd}
F1s	3,4	<i>Fusarium oxysporum</i>	8,1	- nd
F2s	3,4	<i>Fusarium proliferatum</i>	5,7	- nd
F4s	5,0	<i>Fusarium oxysporum</i>	3,9	- nd
F12s	5,0	<i>Fusarium oxysporum</i>	5,4	- nd
F13s	3,4	<i>Fusarium proliferatum</i>	4,6	- nd
F11s	5,0	<i>Fusarium graminearum</i>	37,0	0,86
F10s	2,2	<i>Fusarium graminearum</i>	12,0	0,89
F9s	1,3	<i>Fusarium graminearum</i>	10,0	0,60
F8s	4,6	<i>Fusarium solani</i>	13,0	0,48
F6s	0,3	<i>Fusarium avenaceum</i>	4,6	0,48
F7s	0,3	<i>Fusarium avenaceum</i>	6,2	0,43
F5s	4,6	<i>Fusarium proliferatum</i>	4,0	0,39

^(*nd): não detectado; indica que os valores encontrados estão abaixo do limite de detecção do método (0,2 ppm);

^(a)isolados obtidos de solo; ^(b)Rp: resistência à penetração (MPa) é considerada uma das medidas indiretas do nível de compactação de um solo; ^(c)ppm: partes por milhão.

As micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp., podem ser classificadas em dois tipos gerais: i) tricotecenos não estrogênicos: DON, nivalenol e toxina T-2; e ii) micoestrógenos: zearalenona (ZEA) e zearalenol. Apesar de sua dissimilaridade estrutural a estrogênios, ZEA e vários de seus derivados possuem atividade estrogênica. A produção de zearalenona tem sido associada à isolados de *F. roseum* Link e *F. proliferatum* (sin. *F. moniliforme* J. Sheld.) e seus efeitos estrogênicos podem ser atribuídos à sua complexa estrutura química que a torna uma molécula fitoestrogênica, que são compostos estrogênicos produzidos por plantas/fungos. Como *Fusarium* spp. pode produzir tanto ZEA quanto as micotoxinas não estrogênicas (DON, T-2), em condições adequadas, o problema de contaminação por micotoxinas torna-se multifatorial (DIEKMAN; GREEN, 1992). No Brasil, foi promulgada recentemente uma legislação em que foram estabelecidos os Limites Máximos de Tolerância (LMT) para micotoxinas em alimentos (Anexo 6).

Em uma análise realizada com 24 diferentes isolados de *F. graminearum* associados a giberela na região Sul do Brasil, verificou-se que 67% deles foram capazes de produzir zearalenona, enquanto que 33% dos isolados produziram deoxinivalenol, sendo que o isolado 22 foi considerado altamente toxicogênico, diferenciando-se dos demais na produção de tricotecenos de ZEA (GERALDO et al., 2006). Os autores também apontaram a eficiência na produção de micotoxinas, pelos isolados avaliados, em um substrato à base de arroz e sugeriram também o uso de grãos de milho esterilizados para o crescimento de *Fusarium*.

Ao contrário do observado para zearalenona, nem todos os isolados testados neste trabalho foram eficientes na produção do tricoteceno deoxinivalenol (DON), em ambos os substratos analisados. Para os isolados F3s, F4s e F12s (*F. oxysporum*), F1s e F13s (*F. proliferatum*) os valores encontrados, nos grãos de milho por eles colonizados, foram tão irrisórios que o método utilizado (ELISA) não detectou produção dessa micotoxina. Entretanto, os isolados F2s e F5s (*F. proliferatum*), F11S, F10s e F9s (*F. graminearum*), F8s (*F. solani*) e F6s e F7s (*F. avenaceum*) produziram DON em quantidades superiores ao limite de detecção do método nesse substrato (0,2 ppm).

Tricotecenos, como o DON, formam um amplo grupo de inibidores da síntese de proteínas em eucariotos e, por serem considerados micotoxinas, causam preocupação na comunidade científica em função de seu potencial para contaminação de produtos agrícolas e alimentícios (TOKAY et al., 2005). A produção de deoxinivalenol por isolados de *F. solani* não é comumente relatada. El-Banna et al. (1984) observaram produção de DON, por *Fusarium solani* em tubérculos de diferentes cultivares de batata inglesa durante seu armazenamento. Marasas et al. (1984) não relacionam a produção de DON por diferentes

isolados de *F. solani*. A carência de informações sobre a produção de deoxinivalenol por essa espécie de *Fusarium* é pouco mencionada na literatura, indicando que *F. solani* não seria um potencial produtor de DON.

Contrariamente, são inúmeros os relatos de produção de DON em isolados de *F. avenaceum*, *F. graminearum* e *F. proliferatum*. Neste estudo, observou-se que os isolados F10s e F11s (*F. graminearum*) produziram as maiores quantidades de deoxinivalenol e zearalenona, o que lhes confere uma identidade toxicogênica. Em milho, a produção de tricotecenos (DON, 3-ADON, nivalenol e toxina T2, por exemplo), está associada principalmente a *F. graminearum*, enquanto que *F. avenaceum* e *F. proliferatum* são relacionados a produção de moniliformina (MON) e beauvericina (BEA) (LOGRIECO et al., 2002).

Nesse sentido, um estudo complementar envolvendo os isolados obtidos neste trabalho frente a possibilidade de produção de outros tricotecenos, MON e BEA seria importante, já que houve a confirmação de que eles são capazes de produzir tanto deoxinivalenol quanto zearalenona. Outra análise complementar seria a detecção de fumonisina B1 (FB1) no isolado de *F. proliferatum*, já que essa espécie é comumente mencionada como produtora dessa micotoxina (STANKOVIC et al. 2007; LESLIE et al., 1996). Em virtude dos isolados analisados (Tabela 11) terem sido obtidos de solo, poderia-se inferir que ao infectar as plantas haveria produção das micotoxinas para os quais os mesmos foram testados. As análises apontaram que os isolados de *F. graminearum*, *F. avenaceum* e *F. proliferatum* obtidos de amostras de solo coletadas em diferentes profundidades e níveis de compactação do solo, possuem os *clusters* de genes responsáveis pela produção de DON e ZEA. Ainda, com relação a profundidade de coleta das amostras de solo, os isolados obtidos daquelas coletadas entre 00-05 cm e 05-10 cm foram mais toxicogênicos que os isolados advindos da profundidade 10-15 cm (Tabelas 7 e 11).

Entre as micotoxinas produzidas por *Fusarium*, deoxinivalenol e zearalenona são de especial importância em virtude de serem produzidas ainda na lavoura, antes da colheita. A contaminação de grãos por essas micotoxinas não pode ser totalmente evitada devido a condições ambientais (clima) existentes no campo. Por isso, culturas como trigo e milho tornam-se muito vulneráveis à infecção por *Fusarium* e, conseqüentemente, esses grãos serão altamente contaminados com DON e ZEA quando comparados a outras culturas (DÖLL; DÄNICKE, 2011).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar uma melhor correlação entre as características físicas do solo sob diferentes níveis de resistência à penetração (MPa) quando, na área amostrada, foi implantada a cultura da aveia preta após a soja. Maiores populações de *Fusarium* e *Trichoderma* foram observadas nas camadas de 05-10 e 10-15 cm de profundidade, respectivamente, no perfil do solo, fato que aconteceria em função de uma melhor aeração do ambiente (característica importante para o gênero *Trichoderma*) e condições de maior anaerobiose (que favoreceria a proliferação de fungos do gênero *Fusarium*). Esse último contaria com os exsudatos liberados pelas raízes que, na tentativa de transpor camadas compactadas no solo, proporcionariam ao fungo um substrato completo para seu desenvolvimento e posterior infecção do hospedeiro.

Os dados de identificação morfológica e molecular de *Fusarium* spp. e sua patogenicidade em soja permitiram conhecer que as espécies advindas de ambientes mais compactados pareceram ser as mais agressivas às plântulas, provocando tombamento na maioria dos tratamentos contendo *Fusarium oxysporum* e *F. proliferatum*. Em contrapartida, para a aveia preta que foi semeada em substrato infestado por inóculo de *F. graminearum* não foi observado tombamento, o que poderia indicar que a técnica de infestação de substrato utilizada não foi eficiente para essa espécie do fungo.

Os isolados de *Trichoderma* testados apresentaram um bom potencial para controle de *Fusarium oxysporum* e *F. proliferatum* em plântulas de soja. O fato de tanto o patógeno quanto a maioria dos antagonistas terem sido obtidos dos mesmos pontos de coleta a campo pode ter contribuído com seu bom desempenho, já que esses antagonistas estariam mais adaptados a condições de estresse no ambiente. Esses antagonistas foram identificados como *Trichoderma koningiopsis*, *T. tomentosum* e *T. asperellum*, sendo esse último isolado de solo cultivado com tomateiro, porém, nem por isso menos eficiente que os demais.

Isolados de *F. graminearum*, *F. avenaceum* e *F. solani* se destacaram quanto à produção de ambas as micotoxinas deoxinivalenol e zearalenona, o que os caracterizaria como toxicogênicos. De modo geral, esses isolados foram obtidos de amostras de solo com maior nível de compactação.

CONCLUSÕES

1. A cultura da aveia preta, após cultivo de soja, proporciona melhores correlações entre características físicas do solo e população de *Fusarium*, *Trichoderma* e total para os diferentes níveis de compactação testados
2. A caracterização molecular de *Fusarium* spp. a partir da região TEF-1 α rDNA mostra eficiência para a distinção de complexos de espécies obtidas neste trabalho, separando-as em cinco clados.
3. Os isolados de *Trichoderma* spp. identificados, através da região ITS rDNA, são dois da espécie *T. koningiopsis*, dois *T. tomentosum* e um *T. asperellum*.
4. *F. oxysporum* e *F. proliferatum* são patogênicos para a cultura da soja e provocam tombamento de plântulas.
5. Os isolados de *F. graminearum* F10s e F11s não são patogênicos, ou seja, não provocam tombamento de plântulas de aveia-preta na condição de infestação de substrato testada.
6. Os isolados de *Trichoderma* (T1s-*T. koningiopsis*; T2s-*T. tomentosum*; T3s-*T. koningiopsis*; T4s-*T. tomentosum*; T5s-*T. asperellum*) testados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apresentam potencial para controle de *Fusarium* spp. (F1s, F3s e F4s-*F. oxysporum*; F2s-*F. proliferatum*) em soja. Em aveia preta, os isolados T2s, T4s e T5s promovem o crescimento radicular, destacando-se quanto ao peso fresco de plântulas.
7. Os isolados de *F. graminearum* e *F. solani* produzem ZEA e DON, enquanto *F. proliferatum* e *F. oxysporum* produzem apenas ZEA.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. New York: John Wiley and Sons, 1977. 467 p.

ALLMARAS, R. R.; KRAFT, J. M.; MILLER, D. E. Effects of soil compaction and incorporated crop residue on root health. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 219-243, 1988.

ALLSOP, D.; SEAL, K. J. **Introduction to Biodeterioration**. London: Edward Arnold, 1986. 132 p.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALEXANDER, N.J. et al. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, Madison, v. 48, p. 485-495, 2011.

AMADO, T. J. C. et al. A compactação pode comprometer os rendimentos de áreas sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, n. 89, p. 34-42, 2005.

ANDERSON, T. R.; TENUTA, A. First report of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* causing sudden death syndrome of soybean in Canada. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 448, 1998.

ANTONIOLLI, Z.I. et al. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycological Research**, Manchester, v. 104, n. 1, p. 708-715, 2000.

AOKI, T.; SCANDIANI, M. M.; O'DONNELL, K. Phenotypic, molecular phylogenetic, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. **Mycoscience**, Tokyo, v. 53, n. 3, p. 167-186, 2011.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, p. 162-183, 2005.

AOKI, T. et al. Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex-*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, n. 4, p. 660-684, 2003.

AOKI, T.; O'DONNELL, K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognised as the Group 1 population of *F. graminearum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 91, n. 4, p. 597-609, 1999.

ARAÚJO, A.G.; RODRIGUES, B.N. Manejo mecânico e químico da aveia preta e sua influência sobre a taxa de decomposição e o controle de plantas daninhas em semeadura direta de milho. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 18, n. 1, 2000.

ASTOLFI, P. et al. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 148, n. 3, p. 197-201, 2011.

AKRAMI, M.; GOLZARY, H.; AHMADZADEH, M. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 14, p. 2653-2658, 2011.

BACON, C. W. et al. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Cary, v. 109, p. 325-332, 2001.

BAIRD, R. E. et al. Diversity and longevity of the soybean debris mycobiota in a no-tillage system. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 530-534, 1997.

BAKAN, B. et al. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* Strains Producing Large and Small Amounts of Deoxynivalenol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5472-5479, 2002.

BAKER, R. A; NEMEC, S. Soybean sudden death syndrome: isolation and identification of a new phytotoxin from cultures of the agent causal, *Fusarium solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1144, 1994.

BALARDIN, C. R. et al. Possibilidade de transmissão de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, através da semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 574-581, 2005.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4. ed. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BEDENDO, I.P. Podridões de Raiz e Colo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, A. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 829-837.

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

BETINA, V. **Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification**. Elsevier S. Pub, Amsterdam, 1984. 517p.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.

BOEUF-TREMBLAY, V.; PLANTUREUX, S.; GUCKERT, A. Influence of mechanical impedance on root exudation of maize seedlings at two development stages. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 172, p. 279–287, 1995.

BOMFIM, M.P. et al. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.1, p.61-67, 2010.

BŁASZCZYK, L. et al. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. **Journal of Applied Genetics**, Strzeszyńska, v. 52, p. 233–243, 2011.

BRAIDA, J. A. et al. Resíduos vegetais na superfície e carbono orgânico do solo e suas relações com a densidade máxima obtida no ensaio Proctor. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 605-614, 2006.

BROWN, D.W. et al. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. **Fungal Genetics and Biology**, Madison, v. 41, p. 454–462, 2004.

BRUNS, T.; WHITE, T.; TAYLOR, J. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 22, p. 525-564, 1991.

CALISTRU, C.; MCLEAN, M.; BERJAK P. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species: a study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 137, n. 2, p. 115–124, 1997.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, Lawrence, v. 91, p. 553–556, 1999.

CARTER, M. R. (Ed.) **Soil Sampling and Methods of Analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 631 p.

CARVALHO, D.D.C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 28-34, 2011.

CAVALCANTI, L. S.; COÊLHO, R. S. B; PEREZ, J. O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação de resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 1-5, 2002.

CHEKALI, S. et al. Effects of *Fusarium culmorum* and water stress on durum wheat in Tunisia. **Crop Protection**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 718-725, 2011.

CHENG, Y. H. et al. Prevalence of fumonisin contamination in corn and corn-based feeds in Taiwan. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 15, n. 4, p. 610-614, 2002.

CHU, F. S. Recent studies on immunoassays for mycotoxin. In: BEIER, R. C.; STANKER, L. H. (eds.). **Immunoassays for Residue Analysis: Food safety**. American Chemical Society: Washington, DC, 1996. p. 294-313.

COLE, J. R. **Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins**. New York: Academic Press, 1986. 471p.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2011.

COSTAMILAN, L. M. **O sistema plantio direto e as doenças de soja e de feijão na região Sul do Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo. 9 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online 1). 1999. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do01.htm>. Acesso em: 23 jul. 2009.

CROUCH, J. A. et al. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, Corvallis, v.101, p. 648-656, 2009.

CULLEY, J. L. B.; LARSON, W. E.; RANDALL, G. W. Physical properties of a Typic Haplaquoll under conventional and no-tillage. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 51, p. 1587–1593, 1987.

DAVIS, R. M. et al. Fusarium wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 692-703, 2006.

DEL PONTE, E.M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, Reading, v. 132, p. 1087–1091, 2012.

DEMOLING, F.; FIGUEROA, D.; BÅÅTH, E. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. **Soil Biology & Biochemistry**, [s.l.], v. 39, p. 2485-2495, 2007.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of Trichoderma: III - Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, London, v. 57, p. 363-369, 1971.

DICK, R. P. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. **Agricultural Ecosystems Environmental**, Zürich, v. 40, p. 25-36, 1992.

DODD, S. L. et al. Taxonomy and phylogenetic relationships of two species of *Hypocrea* with *Trichoderma* anamorphs. **Mycological Progress**, Tübingen , v. 1, n. 4, p. 409–428, 2002.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; NELSON, P. E. Production of fumonisin B1 and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 63, p. 1838–1842, 1997.

DIEKMAN, M. A.; GREEN, M. L. Mycotoxins and Reproduction in Domestic Livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 1615-1627. 1992.

DITA, M. A. et al. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. **Plant Pathology**, Sutton Bonington, v. 59, n. 2, p. 348-357, 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-18, 1990.

DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, Fort Collins, v. 102, p. 132–145, 2011.

DRUZHININA, I.; KOPCHINSKIY, A.; KUBICEK, C. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, p. 55–64, 2006.

EGGINS, H. O.; ALLSOP, D. Biodeterioration and biodegradation by fungi. In: SMITH, J. E.; BERRY, D. R. (Eds.). **Industrial Mycology: The filamentous fungi**, v. I, London: Edward Arnold. 1985.

ELAD, Y. et al. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 85-88, 1983.

EL-BANNA, A.A. et al. Formation of Trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in Potatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 47, n. 5, p. 1169-1171, 1984.

ELLIS, M. L. et al. Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, p. 401-407, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. EMBRAPA SOJA. 2007. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em: 17 mai. 2007.

_____. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2006. 306p.

_____. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. 1979. 247p.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and Environmental Application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, Manchester, v. 24, p. 89-98, 1998.

ETHUR, L. Z. et al. Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 19-26, 2008.

ETHUR, L. Z. et al. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 28, p. 17-27, 2006.

ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusarioses em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. **EFSA Journal**, Parma, v. 9, n. 6, p. 2197, 2011.

FAZEKAS, B.; TAR, A. Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, Maryland, v. 84, n. 5, p. 1453-1459, 2001.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE PLANTIO DIRETO NA PALHA Associada a CAAPAS - Confederación de Asociaciones Americanas para la Agricultura Sustentable. **Boletim Informativo**, Ano 8, n. 29, Julho-Setembro, 2007.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11 p. (Special report, 80).

FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT. 1993. 128 p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FIORIN, J. E. Rotação de culturas e as plantas de cobertura do solo. In: FIORIN, J. E. (Coord.). **Manejo e fertilidade do solo no sistema plantio direto**. Passo Fundo: Berthier, 2007. p. 145-184.

FOURIE, G. et al. Evolutionary relationships among the vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 75, p. 4770–4781, 2009.

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

FRIEDL, M. A.; DRUZHININA, I. S. Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. **Microbiology**, Reading, v. 158, p. 69–83, 2012.

FRITZ, D. et al. Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthum* extracts on *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 44-48, 2007.

GALVES, G. E. **Establishment of a program in Brazil for producing disease-free seed of beans (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Cali: CIAT. 1976.

GEISER, D.M. et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence data-base for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 110, p. 473–479, 2004.

GENRO JUNIOR, S. A.; REINERT, D.J.; REICHERT, J.M. Variabilidade temporal da resistência à penetração de um latossolo argiloso sob semeadura direta com rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 477-484, 2004.

GENTILE, A. et al. Origin, divergence and phylogeny of epichloe endophytes of native Argentine grasses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 35, n. 1, p. 196-208, 2005.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium*: a pictorial atlas**. Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land-und. Institut für Mikrobiologie, 1982. 406 p.

GERALDO, M. R. F.; TESSMANN, D. J.; KEMMELMEIER, C. Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 58-63, 2006.

GERBI, S. A. Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. (Ed.). **Molecular evolutionary genetics**. 2. ed. New York: Plenum, 1985. p. 419-517.

GIMENO, A.; RAMOS, A. J.; HERNÁNDEZ, E. Estudio de la producción de deoxinivalenol (DON) por *Fusarium graminearum*. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 9, p. 55-57, 1992.

GIRARDELLO, V. C. et al. Alterações nos atributos físicos de um latossolo vermelho sob plantio direto induzidas por diferentes tipos de escarificadores e o rendimento da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 2115-2126, 2011.

GLYNN, N. C. et al. Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties *majus* and *nivale* to species status. **Mycological Research**, Manchester, v. 109, n. 8, p. 872–880, 2005.

GOMES, E. A. et al. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 477-483, 2002.

GRAY, L. E.; POPE, R. A. Influence of soil compaction on soybean stand, yield and Phytophthora root rot incidence. **Agronomy Journal**, Madison, v. 78, p. 189-191, 1986.

GRIGOLETTI, J. R. A; SANTOS, A.F dos; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 155-165, 2000.

HAGLER, W. M.; MIROCHA, C. J.; PATHRE, S. V. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 37, n. 5, p. 849-853, 1979.

HALLI, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G. E.; KUBICEK, P. K. **Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications**. v. 2. London: Taylor and Francis, 1998. 393 p.

HERSHMAN, D. E. et al. Influence of planting date and cultivar on soybean sudden death syndrome in Kentucky. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, p. 761-766, 1990.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, Stony Brook, v. 66, p. 411-453, 1991.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, Madison, v. 46, p. 615-631, 2009.

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

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 177-180, 2002.

HOWELL, C. R. et al. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 248-252, 2000.

HOWELL, C.R. The role of antibiosis in biocontrol. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Eds). **Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications**. v. 2. London: Taylor and Francis, 1998. p. 173-184.

HU, H.L. et al. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**, Fayetteville, v. 24, p. 1-22, 2007.

IKEDA, K.; TOYOTA, K.; KIMURA, M. Effects of soil compaction on the microbial populations of melon and maize rhizoplane. **Plant and Soil**, Crawley, v. 189, p. 91-96, 1997.

INAM-UL-HAQ M. et al. Role of temperature, moisture and *Trichoderma* species on the survival of *Fusarium oxysporum ciceri* in the rainfed areas of Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 4, p. 1965-1974, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2008. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1259;id_pagina=1>. Acesso em: 24 nov. 2008.

JACKSON, T. A.; REES, J. M.; HARVESON, R. M. **Common stalk rot diseases of corn**. 2009. Disponível em: < <http://www.ianrpubs.unl.edu/eublic/live/ec1898/build/ec1898.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2012.

JACKSON, L. E. et al. Minimum tillage practices affect disease and yield of lettuce. **California Agriculture**, Richmond v. 56, n. 1, p. 35-39, 2002.

JIN, H. et al. Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. **Phytopathology**, v. 86, p. 277–281, 1996.

JOFFE, A. Z. **Fusarium species: their biology and toxicology**. New York: John Wiley and Sons Inc., 1986. 588 p.

JURADO, L. A.; JARRET, H. W. In flow activation of diol-silica with cyanogen bromide and triethylamine for preparing high-performance affinity chromatographic columns. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 984, p. 9-17, 2003.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 937-947, 2005.

KEELING, P. J.; INAGAKI, Y. A class of eukaryotic GTPase with a punctuate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1 alpha. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington DC, v. 101, n. 43, p. 15380-15385, 2004.

KING, S.R.; DAVIS, A.R.; LIU, W.; LEVI, A. Grafting for disease resistance. **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 1673–1676, 2008.

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

KLINGELFUSS, L. H., YORINORI, J. T.; DESTRO, D. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 050-055, 2007.

KONDO, F. et al. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. **Toxicon**, Glasgow, v. 40, p. 893-899, 2002.

KRISTENSEN, R. et al. DNA microarray to detect and identify trichothecene and moniliformin-producing *Fusarium* species. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 102, n. 4, p. 1060-1070, 2007.

KRISTENSEN, R. et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycological Research**, Manchester, v. 109, p. 173-186, 2005.

KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Variabilidade genética entre formas especiais 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**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1481-1485, 2002.

LANDSCHOOT, S. et al. Connection between primary *Fusarium* inoculum on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheat ears in Flanders, Belgium. **Crop Protection**, [s. l.], v. 30, p. 1297-1305, 2011.

LARRALDE-CORONA, C. P. et al. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 80, p. 167-177, 2008.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

LESLIE, J. F. et al., Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and F mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). **Applied Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 62, p. 1182-1187, 1996.

LIU, B.; GLENN, D.; BUCKLEY, K. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, [s.l.], v. 40, p. 1124-1136, 2008.

LOGRIECO, A. et al. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 108, p. 597-609, 2002.

LOGRIECO, A. et al. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 727–731, 1995.

LOPES, F.A.C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, London, v. 116, p. 815-824, 2012.

LÚCIO, C. H.; PINTO, N. F. J.; MARRIEL, I. E. **Otimização do método de Elisa indireto não competitivo para detecção e quantificação de aflatoxina B1 em cereais**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, n. 152). Disponível em:
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/20526/1/Com_152.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2008.

LUCON, C.M.M. et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 225-232, 2009.

LUPATINI, M.; MELLO, A. H.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de *Scleroderma* UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex-Maiden. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2677-2682, 2008.

MACHADO, L. A. Z.; SOUSA, P. G.; HERNANI, L. C. **Slide lavoura de aveia preta**. 1999. Disponível em: <[http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/242258/1/AVEIA PRETA.pdf](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/242258/1/AVEIA_PRETA.pdf)>. Acesso em: 28 nov. 2011.

MALVICK, D. **Fusarium Root Rot**. 2010. University of Minnesota (Extension) - Minnesota Crop Diseases. Disponível Online em:
<<http://www.extension.umn.edu/cropdiseases/soybean/fusarium.html>>. Acesso em: 27 Mar. 2012.

MANICOM, B.Q. et al. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the fusaria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 5, p. 668-672, 1987.

MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. **Toxigenic Fusarium species. Identity and Mycotoxicology**. The Pennsylvania State University Press. U.S.A, 1984. 328p.

MARQUES, E.K. **Diagnóstico genético molecular**. Canoas: ULBRA, 2003. 370p.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods. **Soil Biology & Biochemistry**, [s.l.], v. 43, p. 883-894, 2011.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPDA, 1991. p. 7-23.

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

MENEZES, J. P. et al. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

MESTERHÁZY, Á. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to Fusarium head blight. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 108, p. 675-684, 2002.

MILLER, D.E.; BURKE, D.W. Soil bulk density and water potential on Fusarium moniliformin-producing *Fusarium* species. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 102, p. 1060–1070, 2007.

MILLER, D. E.; BURKE, D. W. Effect of soil aeration and Fusarium root rot of beans. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 519-523, 1975.

MOON, C. D. et al. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes grasses. **Molecular Ecology**, British Columbia, v. 13, n. 6, p. 1455-1467, 2004.

MUKHERJEE, P. K.; RAGHU, K. *Trichoderma* sp. as a microbial suppressive agent of *Sclerotium rolfsii* on vegetables. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 13, p. 497-499, 1997.

NAKAJIMA, T.; MITSUEDA, T.; CHARCHAR, M. J. D. First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. **Japan Agricultural Research Quarterly**, [s.l.], v. 30, p. 31–34, 1996.

NAKAJIMA, T.; MITSUEDA, T.; CHARCHAR, M. J. D. Occurrence of soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* in Brazil. In: International Fusarium Workshop, 7., 1993, Pennsylvania. **Proceedings...** Pennsylvania State University: University Park, 1993. p. 79.

NEISH, G. A.; COHEN, H. Vomitoxin and zearalenone production by *Fusarium graminearum* from winter wheat and barley in Ontario. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 61, p. 811-815, 1981.

NEGRUTSKII, B. S.; EL'SKAYA, A. V. Eucaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, Irvine, v. 60, p. 47-78, 1998.

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.

NESCI, A. et al. Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. **Soil & Tillage Research**, [s.l.], v. 91, p. 143-149, 2006.

NETO, A. L. F. et al. Irrigation and inoculation treatments that increase the severity of soybean sudden death syndrome in the Field. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 2547-2554, 2006.

NEWMAN, K.E.; RAYMOND, S.L. Effects of mycotoxins in horses. In: DIAZ, D.E. (Ed.). **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham: Nottingham University Press. 2005. p. 57-76.

NICOLOSO, R. S et al. Nabo forrageiro: alternativa de ciclagem de nutrientes e escarificação biológica do solo. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 104, p. 28-38, 2008.

NITSCHKE, E.; NIHLGARD, M.; VARRELMANN, M. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, applying restriction fragment analysis of polymerase chain reaction-amplified translation elongation factor 1 α gene fragment. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 921-929, 2009.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, p. 919-938, 2000a.

O'DONNELL, K. et al. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, DC, v. 97, p. 7905–7910, 2000b.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy Science**, Washington, DC, v. 95, p. 2044-2049, 1998.

OLIVEIRA, V. C; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* de *F. solani* f.sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 631-634, 2002.

OYARBIDE, F.; OSTERRIETH, M. L.; CABELLO, M. *Trichoderma koningii* as a biomineralizing fungous agent of calcium oxalate crystals in typical Argiudolls of the Los Padres Lake natural reserve (Buenos Aires, Argentina). **Microbiological Research**, [s.l.], v. 156, p. 113–119, 2001.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 23-54, 1985.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; McCLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals, a review. **Plant Pathology**, Sutton Bonington, v. 44, p. 207-238, 1995.

PATRICK, Z. A.; TOUSSOUN, T. A.; KOCH, L. W. Effect of crop residue decomposition products on plant roots. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 2, p. 267-292, 1964.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 275 p.

PIOLI, R. N.; MOZZONI, L.; MORANDI, E. N. First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 220, 2004.

PLOPER, L. D.; YORINORI, J. T.; MOREL PAIVA, W. Importancia de las enfermedades de la soja en el Mercosur (in Spanish). In: ACTAS SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE SOJA - CONGRESO DE AAPRESID, 11., 2003, Rosario. **Anais...** Rosario: Tomo II, 2003. p. 163–174.

PLOPER, D. Síndrome de la muerte súbita: nueva enfermedad de La soja en el noroeste argentino. **Avance Agroindustrial**, San Miguel de Tucumán, v. 13, n. 54, p. 5–9, 1993.

PROCTOR, R. H. et al. Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium*. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 74, n. 5, p. 1128–1142, 2009.

RABEENDRAN, N. et al. Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. **New Zealand Plant Protection**, Christchurch, v. 53, p. 143-146, 2000.

REIS, E. M. Perithecial formation on *Gibberella zeae* on senescent stems of grasses under natural conditions. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 52-53, 1990.

REIS, E.M. **Doenças do trigo III: Giberela**. 2 ed. São Paulo: Bayer, 1988. 13p.

REHNER, S.A. 2001. **Primers for elongation factor 1-a (EF1-a)**. Disponível Online em: <<http://www.nacse.org/yfaaberg/aftol/EF1primer.pdf>>. Acesso em 13 jun. 2012.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2.ed. New York: Academic, 1984. 422p.

RILEY R. T. Mechanistic Interactions of Mycotoxins: Theoretical considerations. In: SINHA, K. H.; BHATNAGAR, D. (eds.). **Mycotoxins in Agriculture and Food Safety**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1998, p.227-253.

RITZ, K.; YOUNG, I.M. Interactions between soil structure and fungi. **Mycologist**, Manchester, v. 18, p. 52-59, 2004.

ROJO, F. G. et al. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. **Crop Protection**, [s.l.], v. 26, p. 549–555, 2007.

ROTTER, B. A.; PRELUSKY, D. B.; PESTKA, J. J. Toxicology of Deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology Environmental Health**, [s.l.], v. 48, p. 1-34, 1996.

RUPE, J. C. Differentiation of the sudden death syndrome pathogen of soybean, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, from other isolates of *F. solani* based on cultural morphology, pathogenicity, and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 79, p. 829–835, 2001.

SALTON, J. C.; HERNANI, L. C.; FONTES, C. Z. **Sistema plantio direto**: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa Produção da Informação. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 1998. 248 p.

SAMUELS, G. J. et al. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 56, p. 67–133, 2006.

SANTOS, H. A.; MELLO, S.C.M.; PEIXOTO, J.R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e Ácido Indol-3-Butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 966-972, 2010.

SANTOS, H. A. ***Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008, 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade de Brasília, Brasília. 2008.

SANTOS, H. P.; REIS, E. M.; BAIER, A. C. Sistemas de cultivo para triticales. I.Efeitos no rendimento de grãos e nas doenças do sistema radicular do triticales, e outras culturas de verão, em plantio direto, 1987 e 1988. In: Reunião Brasileira de Triticales, 3., 1990, Cascavel. **Anais...** Cascavel: OCEPAR, 1990. p. 235-244.

SAREMI, H. et al. Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v.31, p. 941-947, 1999.

SCHAAFSMA, A. W.; HOOKER, D. C. Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 119, p. 116-125, 2007.

SCHERM, H.; YANG, X. B.; LUNDEEN, P. Relationship of soil factors to severity of sudden death syndrome of soybean in Iowa. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 84, 1996.

SEIFERT, K. A.; LEVESQUE, C. A. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 110, p. 449–471, 2004.

SINHA, K.K.; BHATNAGAR, D. **Mycotoxins in Agriculture and Food Safety**. New York: Marcel Dekker, 1998. 511p.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1992. 105p.

SILVA, V. N. et al. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1609-1618, 2011.

SILVA, V. R.; REICHERT, J. M.; REINERT, D. J. Variabilidade espacial da resistência do solo à penetração em plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 34, p. 399-406, 2004.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7., 2009, Reno. **Anais...** Reno. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

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

SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN, G.E., KUBICEK, C.P. (Eds.). **Trichoderma and Gliocladium**, v. 1. London: Taylor and Francis Ltd., 1998. pp. 139–191.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**. John Wiley and Sons Inc: Chichester, UK, 1985. 148p.

SODERBERG, K. H.; BÅÅTH, E. Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. **Soil Biology & Biochemistry**, [s.l.], v. 30, p. 1259-1268, 1998.

SOUZA FILHO, A. P. S.; DUARTE, M. L. R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, p. 227-230, 2007.

SOUZA, Z. M. et al. Variabilidade espacial de atributos físicos em um Latossolo Vermelho distrófico sob semeadura direta em Selvíria (MS). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 699-707, 2001.

STANKOVIC, S. et al. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 118, p. 165-172, 2007.

STATSOFT. **Statistica 7.0**. Disponível em: <www.statsoft.com>. 2004. Acesso: 15 jun. 2010.

STEINDORFF, A. S. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. **Biological Control**, [s. l.], v. 61, p. 134-140, 2012.

STONE, L. R.; SILVEIRA, P. M. da. Efeitos do sistema de preparo e da rotação de culturas na porosidade e densidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 395-401, 2001.

SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 4, p. 195-209, 1982.

TACKE, B. K.; CASPER, H. H. Determination of deoxynivalenol in wheat, barley and malt by column clean-up and gas chromatography with electron capture detection. **Journal of AOAC International**, Maryland, v. 79, n. 2, p. 472-475, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre : Editora Artmed, 2005. 848p.

TAMURA, K. et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOLEDO-SOUZA, E. D. et al. Sistemas de cultivo, sucessões de culturas, densidade do solo e sobrevivência de patógenos de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.971-978, 2008.

TOKAI, T. et al. Concordant evolution of trichothecene 3-O-acetyltransferase and an rDNA species phylogeny of trichothecene-producing and non-producing fusaria and other ascomycetous fungi. **Microbiology**, Reading, v. 151, p. 509-519, 2005.

TU, J. C. Effects of soil compaction, temperature, and moisture on the development of the *Fusarium* root rot complex of pea in southwestern Ontario. **Phytoprotection**, Québec, v. 75, n. 3, p. 125-131, 1994

VAZQUEZ, L. et al. Soil penetrometer resistance and bulk density relationships after long-term no tillage. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 22, p. 2101-2117, 1991.

VIANA, J. H. M., **Distribuição espacial de atributos físico-químicos, mineralógicos e micromorfológicos de Latossolos visando o mapeamento de áreas produtivas**. 2005. 194p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, [s.l.], v. 40, p. 1-10, 2008.

WAKELIN, S. A. et al. Management factors affecting size and structure of soil *Fusarium* communities under irrigated maize in Australia. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 39, p. 201–209, 2008.

WATANABE, M. et al. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 91, p. 2500–2504, 2011.

WATANABE, E. et al. Immunoaffinity column cleanup for the determination of imazalil in citrus fruits. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 433, p. 199-206, 2001.

WEAVER et al: Effect of zearalenone on dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 47, p. 1826-1828, 1986.

WILHITE, S. E.; LUMSDEN, R. D.; STRANEY, D .C. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 67, p. 5055-5062, 2001.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J.; (Eds). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press: San Diego, 1990. p. 315–322.

WOO, S. L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 181–185, 2005.

YORINORI, J. T. (2002) Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul (in Portuguese). In: Brazilian Soybean Congress – Mercosoja, 2., 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Foz do Iguaçu, 2002. p. 181–183.

YORINORI, J. T. Situação Atual das Enfermidades de soja na Bolívia, Brasil e Paraguai (in Portuguese). In: Mercosoja, 1999, Rosario, Argentina. **Proceedings...** Rosario, 1999. p. 40–43.

YUYAMA, M. M.; HENNING, A. A. Ocorrência de *Fusarium* do grupo *roseum* em sementes de soja: levantamento e identificação da espécie. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja (Embrapa Soja Documentos, 124), p. 453.

ZHANG, J. B. et al. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. **Mycological Research**, Manchester, v. 111, p. 967- 975, 2007.

ZHAO, M. et al. Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 783, p. 401-410, 2003.

ANEXOS

Anexo 1 - 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
- 0,05 mg 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 2 - Meio de cultura Ágar-Ágar (AA)

- 15 g de ágar
- 1 L de água destilada
- 0,05 mg 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 Sintético - Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)

- 1 g de KH_2PO_4
- 1 g de KNO_3
- 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g de KCl
- 0,2 g de glicose
- 0,2 g de sacarose
- 20 g de ágar
- 1 L de água destilada

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Blackwell Publishing, Ames, USA, 388 pp. 2006.

Anexo 4 - Meio de cultura Folha de Cravo-Ágar (FCA ou CLA)

- 20 g de ágar
- 1 L de água destilada
- 2 ou 3 pedaços de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) esterilizadas (60°C/72h)

FISHER, N.L. et al. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 151-153, 1982.

Anexo 5 - 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
- 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura

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

Anexo 6 - Limites máximos tolerados para micotoxinas no Brasil. Adaptado de MAPA (2011)

Micotoxina	Alimento	Limite Máximo Tolerado – LMT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		2011	2012	2014	2016
Deoxinivalenol (DON)	Arroz beneficiado e derivados	750			
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200			
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada		2000	1500	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada		1750	1250	750
	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada			20	
	Trigo e milho em grãos para posterior processamento			3000	
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20			
Zearalenona (ZEA)	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada		200		100
	Farelo de arroz		1000		600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho		300		150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo		400		200
	Milho em grão e trigo para posterior processamento			400	
	Arroz integral				400

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA.
Resolução - RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Disponível Online em:
 <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Análise química de solo realizada pelo Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Solos / CCR / UFSM

(Média das coletas realizadas)

Rp (MPa)*	Profundidade**	pH	cmol _c /dm ³				Saturação de bases	% MO	% Argila	P-Mehlich	cmol _c /dm ³	
			Ca	Mg	Al	H+Al					K	CTC pH 7,0
0,3	00-10	5,5	3,2	1,7	0,0	1,6	71	2,6	34	13,5	0,46	7,6
	10-20	5,5	2,8	1,4	0,2	2,8	67	2,0	34	3,0	0,12	6,5
1,3	00-10	5,8	3,3	1,8	0,0	1,2	78	2,0	39	3,7	0,34	7,0
	10-20	5,5	3,0	1,8	0,0	1,1	75	1,7	36	3,7	0,25	6,7
2,2	00-10	6,0	3,6	1,9	0,1	1,2	78	3,3	39	15,3	0,66	7,9
	10-20	5,5	2,7	1,4	0,2	2,8	68	1,8	46	1,5	0,26	6,4
3,4	00-10	6,0	3,6	1,9	0,0	1,7	78	4,1	38	8,4	0,36	7,5
	10-20	5,8	3,5	2,0	0,0	2,0	77	2,1	47	2,2	0,14	7,3
4,6	00-10	6,4	2,9	1,7	0,0	1,1	65	2,4	39	26,9	0,64	8,0
	10-20	6,9	3,2	1,9	0,0	2,0	77	1,4	34	4,5	0,41	7,2
5,0	00-10	6,3	3,2	1,4	1,2	1,6	66	2,1	35	76,0	0,66	8,0
	10-20	6,9	3,0	1,8	3,1	1,1	63	1,4	34	1,5	0,18	7,9

* Rp: Resistência à penetração (MPa); ** profundidade de coleta.