

## Detecção de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e antagonismo de *Trichoderma* sp. em soja sob plantio direto

## Detection of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. and antagonism of *Trichoderma* sp. in soybean under no-tillage

Paola Mendes Milanese<sup>1\*</sup>; Elena Blume<sup>2</sup>; Marlove Fátima Brião Muniz<sup>2</sup>; Lia Rejane Silveira Reiniger<sup>3</sup>; Zaida Ines Antonioli<sup>4</sup>; Emanuele Junges<sup>5</sup>; Manoeli Lupatini<sup>6</sup>

### Resumo

Este trabalho objetivou *i)* quantificar a ocorrência de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo rizosférico, com e sem sintomas de Síndrome da Morte Súbita (SMS), em oito genótipos de soja; *ii)* identificar morfologicamente *Fusarium* spp. de raízes; *iii)* avaliar relações antagônicas entre *Trichoderma* e *Fusarium*, isolados de solo rizosférico e raízes de plantas com e sem sintomas de SMS, respectivamente e *iv)* caracterizar, através da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, os isolados de *Trichoderma* spp. com melhor desempenho no teste de confrontação direta. As coletas de solo e raízes foram realizadas em uma área experimental localizada em Cruz Alta, RS, Brasil. Em laboratório, foram realizadas diluições seriadas das amostras de solo, contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs/g<sup>-1</sup> de solo rizosférico) e isolamento para identificação de isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e teste de confrontação direta. Houve diferença significativa entre as populações de *Trichoderma* spp. em solo rizosférico de plantas com e sem sintomas de SMS. Para a população de *Fusarium* spp., foi constatada diferença significativa apenas em solo rizosférico de plantas sem sintomas da doença. Em raízes doentes, foram identificadas as espécies *F. solani*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* e *F. verticillioides*. No teste de confrontação direta, oito isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram o melhor desempenho no antagonismo a *Fusarium* spp. Os isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de plantas com sintomas de SMS mostraram maior eficiência de controle *in vitro*. Esses isolados apresentaram alta similaridade com espécies do agregado *T. koningii*.

**Palavras-chave:** *Glycine max* (L.) Merrill, fungos, população, podridão radicular, controle biológico

### Abstract

This study aimed *i)* to quantify the occurrence of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. in rhizospheric soil, with and without symptoms of Sudden Death Syndrome (SDS) in eight soybean genotypes;

<sup>1</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Pós-Doutoranda em Ciência do Solo, PDJ/CNPq, Dept<sup>o</sup> de Solos, Laboratório de Biotransformações do Carbono e do Nitrogênio, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Centro de Ciências Rurais, CCR, Santa Maria, RS. E-mail: paola.milanesi@gmail.com

<sup>2</sup> Prof<sup>as</sup> Associada de Fitopatologia, Dept<sup>o</sup> de Defesa Fitossanitária, UFSM/CCR, Santa Maria, RS. E-mail: elenablu@gmail.com; marlovemuniz@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Prof<sup>a</sup> Associada de Melhoramento Vegetal, Dept<sup>o</sup> de Fitotecnia, UFSM/CCR, Santa Maria, RS. E-mail: liarejanasilveirareiniger@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Prof<sup>a</sup> Associada de Biologia do Solo, Dept<sup>o</sup> de Solos, Laboratório de Biologia do Solo e do Ambiente, UFSM/CCR, Santa Maria, RS. E-mail: zantonioli@gmail.com

<sup>5</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Discente de Doutorado em Agronomia, Dept<sup>o</sup> de Defesa Fitossanitária, Laboratório de Fitopatologia, UFSM/CCR, Santa Maria, RS. E-mail: manujunges@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Discente de Doutorado em Ciência do Solo, Bolsista CAPES. Dept<sup>o</sup> de Solos, Laboratório de Biologia do Solo e do Ambiente, UFSM/CCR, Santa Maria, RS. E-mail: mlupatini@gmail.com

\* Autora para correspondência

ii) morphologically identify isolates of *Fusarium* spp. from plants roots with SDS; iii) evaluate the antagonism between *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. isolates from rhizospheric soil and roots from with and without SDS, respectively; and iv) characterize through the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA the isolates of *Trichoderma* spp. with better performance in the direct confrontation. The sampling of soil and roots was performed in an experimental area located in Cruz Alta, RS, Brazil. In the laboratory, serial dilutions of soil samples, counting of the number of Colony Forming Units (UFCs/g<sup>-1</sup> of rhizospheric soil) were performed as well as isolation for identification of isolates of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. and testing of direct confrontation. There were significant differences between the population of *Trichoderma* spp. in the rhizosphere of plants with and without symptoms of SDS. For the population of *Fusarium* spp., significant difference was observed only in the rhizosphere of plants without symptoms of SDS. In diseased roots the following species were identified: *F. solani*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* and *F. verticillioides*. In the test of direct confrontation, eight isolates of *Trichoderma* spp. achieved the best performance in the antagonism to *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. from areas with symptoms of SDS had a higher control efficiency *in vitro*. These isolates showed high similarity to the species of *T. koningii* aggregate.

**Key words:** *Glycine max* (L.) Merrill, fungi, population, root rot, biological control

## Introdução

Entre as doenças que podem estar associadas à soja (*Glycine max* (L.) Merrill), a Podridão Vermelha da Raiz (PVR) ou Síndrome da Morte Súbita (SMS), causada pelo complexo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (AOKI; O'DONNELL; SCANDIANI, 2005), é uma das mais importantes em função do difícil controle. A SMS se caracteriza por manchas avermelhadas, mais visíveis na raiz principal e, geralmente, localizadas a 1 ou 2 cm abaixo do nível do solo. Com a evolução da infecção, é observada uma expansão da lesão, que passa a circundar a raiz, assumindo coloração castanho-avermelhada escura e, à medida que as lesões evoluem, pode ser observada uma massa azulada formada por conídios do patógeno (FREITAS; MENEGHETTI; BALARDIN, 2004). Perdas causadas pela SMS dependem de vários fatores, incluindo o estágio de desenvolvimento da planta no momento da infecção pelo patógeno, genótipo utilizado e condições ambientais existentes (ROY et al., 1997).

Na rizosfera existe uma comunidade microbiana complexa na qual uma grande variedade de interações é desenvolvida. Essa região possui características de composição e estrutura influenciadas pelo ciclo vegetativo e umidade do solo (PEREIRA, 2000). Nesse ambiente, além dos micro-organismos patogênicos, também existem fungos, bactérias e actinobactérias que possuem atividade contra

fitopatógenos, a partir da produção de metabólitos antimicrobianos secundários (antibiose), enzimas líticas, entre outros (RAAIJMAKERS et al., 2009).

Nesse sentido, um método que pode ser empregado contra patógenos de solo é o controle biológico, sendo o gênero *Trichoderma* um dos mais utilizados, representando fungos não-patogênicos que exercem antagonismo a vários fitopatógenos através do parasitismo e/ou antibiose. Esses fungos têm sido utilizados com bastante sucesso como agentes de biocontrole, promotores de crescimento e na melhoria da germinação e sanidade de sementes (ETHUR et al., 2006). De acordo com Howel (2003), espécies de *Trichoderma* são capazes de suprimir o desenvolvimento de vários organismos fitopatogênicos, tais como *Pythium ultimum* Trow 1901, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn 1858 e *Phytophthora* spp. e seus mecanismos antagonistas podem ser influenciados pelo tipo de solo, condições de temperatura e umidade, além da microbiota associada.

Fungos do gênero *Trichoderma* também são relatados como nativos na rizosfera de algumas culturas, como de citros (GESHEVA, 2002), de batata, de algodão (SIVAN; CHET, 1989) e de tomate (LARKIN; FRAVEL, 1998). A capacidade deste fungo em colonizar esse ambiente foi comprovada (COOK, 1993; ETHUR et al., 2008), assim como sua correlação negativa com a incidência de

doenças radiculares em crisântemo (MENEZES, 2007). No entanto, há carência de informações sobre sua caracterização e interação com *Fusarium* spp. em áreas cultivadas com soja, assim como a potencialidade de isolados desse antagonista, obtidos de solo de tais áreas, no controle de SMS.

O presente estudo teve por objetivos quantificar as populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo rizosférico de plantas com e sem sintomas de SMS; identificar morfologicamente os isolados de *Fusarium* obtidos; selecionar e caracterizar, através da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, isolados de *Trichoderma* com capacidade antagonista a *Fusarium* spp. com potencial para uso futuro no manejo de SMS.

## Material e Métodos

Amostras de solo rizosférico e raízes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (safra 2008/2009) foram coletadas em uma área experimental da Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa Fecotriga (FUNDACEP – CCGL), em Cruz Alta – RS, conduzida sob sistema plantio direto há, aproximadamente, 23 anos. O solo da área onde foram realizadas as coletas está classificado como um Latossolo Vermelho distrófico típico argiloso (EMBRAPA, 1999). A classificação climática, segundo Köppen, é Cfa1g2, ou seja, subtropical úmido sem estiagem típica. A temperatura média do mês mais quente é superior a 22 °C e do mês mais frio é superior a 3 °C e inferior a 18 °C. A precipitação média anual é maior do que 1600 mm, com tendência de maiores precipitações na primavera e no verão (MORENO, 1961).

Foram coletadas amostras de solo na profundidade de 0-0,10 m, nas parcelas experimentais, para a sua caracterização química e física. Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal de Santa Maria. O solo da área experimental apresentou em média 500 g kg<sup>-1</sup> de argila, portanto, pertencente à Classe Textural 2 (CQFS – RS/SC, 2004). As características químicas

do solo na mesma camada foram: pH: 5,0; matéria orgânica do solo (MOS): 3,8%; P: 1,72 mg dm<sup>-3</sup>; K: 0,414 cmolc dm<sup>-3</sup>; Al: 0,2 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca: 5,1 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg: 2,1 cmolc dm<sup>-3</sup>; e CTC: 12,0%.

Nessa área, a rotação de culturas incluía soja/milho durante o verão e azevém ou trigo nos meses de inverno. Durante o estágio de pleno enchimento das vagens da soja (R<sub>5</sub>) (FEHR; CAVINESS, 1977), foram coletadas nas parcelas experimentais (cada uma com área de 25 m<sup>2</sup>) aleatoriamente, quatro plantas com sintomas e quatro sem sintomas de SMS, dos seguintes genótipos oriundos de programas de melhoramento genético: CEPS 06006 RR, CEPS 06002 RR, FUNDACEP 53 RR, CEPS 06010 RR, CEPS 06005 RR, CEPS 06015 RR, FUNDACEP 55 RR e CEPS 06031 RR, totalizando oito tratamentos. Para a coleta das amostras foi utilizada uma pá de corte que foi lavada com água e desinfestada com hipoclorito de sódio 1% e etanol 70%, entre as repetições.

Para o isolamento de *Fusarium* spp., as raízes principais foram primeiramente lavadas em água corrente e desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, etanol 70% por 1 min e lavadas em água destilada esterilizada por três vezes seguidas. Posteriormente, as raízes foram colocadas em caixas do tipo Gerbox, com papel filtro esterilizado e umedecido, e incubadas durante 48 h a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h, em incubadora do tipo BOD. Para o isolamento, estruturas reprodutivas de *Fusarium* spp. foram removidas com auxílio de alças esterilizadas para meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e 1000 mL água destilada), para obtenção de culturas puras e posterior identificação.

Além disso, foram feitas diluições seriadas do solo rizosférico para a quantificação de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. As amostras de solo das quatro plantas coletadas foram reunidas, formando uma amostra composta, e 5 g de solo de cada tratamento

foram diluídos em 95 mL de água destilada esterilizada, acrescida de duas gotas de Tween 80™ (Merck, Germany). Os frascos contendo a suspensão foram colocados em agitador do tipo Fisher – Flexa Mix™ (USA) por 10 minutos e, a partir dessa, foram feitas diluições seriadas até o fator  $10^{-4}$ . Em seguida, 0,5 mL dessas diluições foram inoculados, em quatro placas de Petri, contendo 15 mL de meio BDA, acrescido de 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura, e incubadas por 5 dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 h em incubadora do tipo BOD.

A contagem das colônias de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foi feita sobre o fator de diluição serial  $10^{-3}$ , por meio de observação visual das colônias com base em bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999). O número de UFCs de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foi determinado de acordo com equações propostas por Carter (1993). Após a contagem de UFCs, foi realizada a identificação dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma* através da visualização de estruturas reprodutivas em microscópio ótico. As colônias de *Trichoderma* morfológicamente diferentes foram repicadas para meio de cultura BDA para posterior identificação baseada em métodos moleculares e utilização no teste de confrontação direta, no qual sua ação antagonista foi avaliada contra isolados de *Fusarium*. Culturas monospóricas foram obtidas para *Trichoderma* conforme a técnica de cultura monospórica descrita por Fernandes (1993) e, em seguida, foram cultivadas em meio BDA. Para sua manutenção, discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram colocados em microtubos esterilizados e armazenados sob refrigeração (4 °C) até o momento de sua utilização.

Para a identificação de *Fusarium* spp. por meio de caracteres morfológicos, as colônias do fungo obtidas a partir 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, 20 g de ágar e 1000 mL água destilada). Após 24 h de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a observação dos conídios germinados em meio AA, através de microscópio ótico. Os conídios que germinaram isoladamente foram repicados para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA (para observação da cor e mensuração da colônia), e para placas de Petri contendo meio de cultura Folha de Cravo-Ágar (CLA, 20 g de ágar, 1000 mL de água destilada e 3 pedaços de folhas de cravo, *Dianthus caryophyllus* L., esterilizadas à 60 °C/72 h), que permitiu a melhor caracterização de macroconídios, microconídios e clamidósporos. O material foi incubado a 25 °C e fotoperíodo de 12 h durante 10-14 dias. Após esse período, realizou-se a observação das microestruturas do fungo em microscópio estereoscópico e ótico e procedeu-se a identificação das espécies de acordo com chaves de classificação propostas por Gerlach e Nirenberg (1982), Nelson, Tousson e Marasas (1983) e Leslie e Summerell (2006).

Para avaliar o possível antagonismo de *Trichoderma*, foi realizado o teste de confrontação direta *in vitro*. Para isso, foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* e nove isolados de *Fusarium* obtidos na etapa acima descrita. Um disco de meio de cultura BDA com 12 mm de diâmetro, contendo micélio de *Fusarium*, foi transferido para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro), também contendo 15 mL de meio BDA, e colocado a 0,5 cm da borda da placa. As placas foram incubadas por 48 h a  $25 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12 h em incubadora do tipo BOD. Após esse período, um disco de meio de cultura BDA, também com 12 mm de diâmetro, contendo micélio de *Trichoderma*, foi transferido para a posição oposta ao disco de micélio de *Fusarium* nas placas de Petri (a 0,5 cm da borda da placa). As placas foram incubadas durante 7 dias a  $25 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12 h (CARVALHO et al., 2011). Decorrido esse tempo, as placas foram avaliadas de acordo com o critério de Bell, Wells e Markham (1982), baseado em uma escala de notas variando

de 1 a 5, na qual em 1 – *Trichoderma* cresce e ocupa toda a placa; 2 – *Trichoderma* cresce e ocupa uma parte do patógeno (*Fusarium*) (2/3 da placa); 3 – *Trichoderma* e *Fusarium* crescem até a metade da placa (nenhum domina o outro); 4 – *Fusarium* cresce e ocupa uma parte do *Trichoderma* (2/3 da placa); e em 5 – *Fusarium* cresce e ocupa toda a placa de Petri. Em seguida, as notas do antagonista foram agrupadas em classes (CARVALHO et al., 2011).

Os isolados de *Trichoderma* obtidos de solo rizosférico de soja com e sem sintomas de SMS, cujo desempenho foi mais eficiente em teste de confrontação direta, foram caracterizados por métodos moleculares. Tais isolados receberam os seguintes códigos de identificação: T53d, T55d, T002dA, T002dB, T031d, T006s, T005s e T002sB, em que: “d” representa isolado de planta doente e “s” isolado de planta sadia; “A” e “B” indicam isolados morfológicamente diferentes obtidos de um mesmo genótipo de soja. Para o estudo molecular desses isolados, os mesmos foram cultivados em meio de cultura Caldo Batata (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose e 1000 mL água destilada) por 10 dias, a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. A extração de DNA foi realizada a partir do micélio, de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990). Nas reações de PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS 1 e ITS 4 (WHITE et al., 1990). A reação totalizou 25 µL contendo aproximadamente 30 ng de DNA, tampão 10X (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 0,1% de tween 10; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2,5 µM de cada dNTP, 20 nM de MgCl<sub>2</sub>, 25 ηmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Biogen), 5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies) e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 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, o produto foi mantido a – 4 °C. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído nas amplificações do PCR. Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 13% e, nas reações de sequenciamento, utilizaram-se os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4. Para estas reações, foi seguido o protocolo fornecido pelo fabricante (Biogen).

Os fragmentos sequenciados foram analisados e comparados com sequências já existentes através da ferramenta BLAST, contra a base de dados do GenBank, sediado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1997), a fim de comparar similaridades com outras espécies de *Trichoderma*. 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; HIGGINS; GIBSON, 1994). A análise filogenética foi conduzida utilizando-se o método de Máxima Verossimilhança com 5000 replicatas pelo programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2007). Para construção dos dendrogramas, foram utilizadas as sequências de *Trichoderma* spp. apresentadas na Tabela 1 .

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Devido ao fato dos dados não seguirem uma distribuição normal, foram empregados testes não-paramétricos. Assim, os valores estimados em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por grama de solo rizosférico foram submetidos à análise da variância pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis (SIEGEL; CASTELLAN, 2006). Para o teste de confrontação direta, a comparação entre as notas atribuídas a cada isolado foi feita através do Teste U de Mann-Whitney. Essas análises foram feitas com auxílio do programa estatístico STATISTICA 7.0.

**Tabela 1.** Códigos de acesso no *GenBank* para os isolados de *Trichoderma* spp. (região ITS) utilizados neste estudo. Santa Maria, RS, 2013.

Origem	Isolado	Código de acesso	Referência
Nova Zelândia	<i>T. dorotheae</i> GJS 99-97	DQ333547	Samuels et al. (2005)
Brasil	<i>Trichoderma</i> sp.T002dB	KC481705	Milanesi et al. (2013)
Nova Zelândia	<i>T. dorotheae</i> GJS 99-202	DQ313144	Samuels et al. (2006)
Nova Zelândia	<i>T. dorotheae</i> GJS 99-202	DQ313145	Samuels et al. (2006)
Austrália	<i>T. dorotheae</i> GJS 99-194	DQ313136	Samuels et al. (2006)
Equador	<i>T. ovalisporum</i> Dis 70a	AY380897	Holmes et al. (2004)
Brasil	<i>T. ovalisporum</i> Dis 172h	AY380896	Holmes et al. (2004)
China	<i>T. koningii</i> CCRC33566	AF414312	Lee; Hseu (2002)
China	<i>T. koningii</i> CCRC33563	AF414310	Lee; Hseu (2002)
Nova Zelândia	<i>T. koningii</i>	AF055211	Dodd et al. (2000)
Índia	<i>T. koningiopsis</i> IBSD-GF6	KC428393	Devi (2012)
Brasil	<i>T. koningiopsis</i> UFSM-Tr3s	KC155358	Milanesi et al. (2012)
Brasil	<i>Trichoderma</i> sp.T53d	KC481709	Milanesi et al. (2013)
Brasil	<i>Trichoderma</i> sp.T005s	KC481707	Milanesi et al. (2013)
Brasil	<i>Trichoderma</i> sp.T002sB	KC481706	Milanesi et al. (2013)
Brasil	<i>Trichoderma</i> sp.T006s	KC481708	Milanesi et al. (2013)
Brasil	<i>Trichoderma</i> sp.T002dA	KC481704	Milanesi et al. (2013)
China	<i>Hypocrea koningii</i> PKU F2	KC113283	Singh et al. (2012)
Índia	<i>T. koningiopsis</i> NBAlI(N)KA 8A-Tk	GU479416	Roopa et al. (2010)
China	<i>T. harzianum</i> A14	KC139307	Yao (2012)
China	<i>T. harzianum</i> A12	KC139308	Yao (2012)
Brasil	<i>T. harzianum</i> UFMGCB 3518	JQ418366	de Faria et al. (2011)
Brasil	<i>T. harzianum</i> UFMGCB 3517	JQ418474	de Faria et al. (2011)
Estados Unidos	<i>Fusarium oxysporum</i> 0531	EF464166	Zhang et al. (2007)

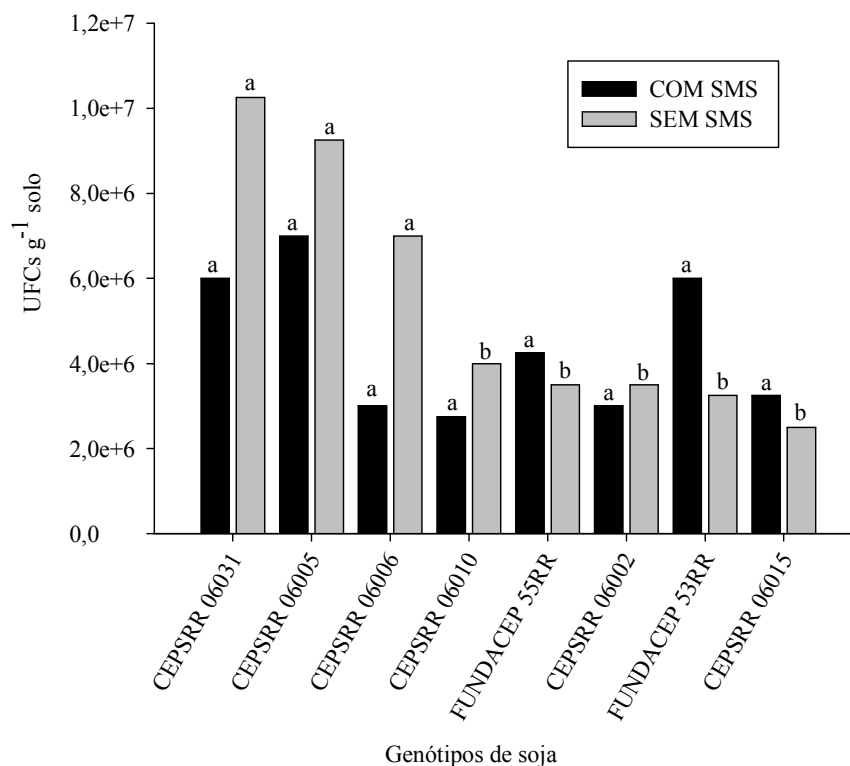
**Fonte:** Elaboração dos autores. Adaptado de: National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

## Resultados e Discussão

A análise comparativa da ocorrência de fungos do gênero *Fusarium* e *Trichoderma* entre genótipos de soja foi realizada separadamente para plantas com e sem sintomas de Síndrome da Morte Súbita. Houve diferença significativa no número de unidades formadoras de colônias de *Trichoderma* entre genótipos, tanto em plantas com sintomas como sem sintomas de SMS. Entretanto, para

*Fusarium* verificou-se diferença significativa apenas em plantas sem sintomas da doença (Figura 1). As maiores médias para a população de *Fusarium*, em plantas sem sintomas, foram encontradas nos genótipos CEPS 06031 RR, CEPS 06005 RR e CEPS 06006 RR. O menor número de unidades formadoras de colônias de *Fusarium* foi observado a partir de amostras do genótipo CEPS 06015 RR em solo rizosférico.

**Figura 1.** População de *Fusarium* spp. em solo rizosférico de genótipos de soja, com e sem sintomas de Síndrome da Morte Súbita (SMS), em sistema plantio direto. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis. Santa Maria, RS, 2007.



**Fonte:** Elaboração dos autores.

As variações que ocorrem na comunidade microbiana da rizosfera são dependentes do tipo de solo, espécie vegetal e cultivar utilizada, visto que estas produzem exsudatos ricos em determinados compostos mais favoráveis a alguns grupos de micro-organismos rizosféricos. Algumas substâncias presentes na rizosfera podem atuar como alelopáticas, inibindo ou estimulando esses indivíduos, entre outras cuja ação pode ser de sinalização molecular a fim de estabelecerem-se simbioses mutualísticas ou parasíticas entre os micro-organismos e as plantas. Estas relações influenciam também as populações de antagonistas existentes nesse ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nesse sentido, a diferença nas populações de *Fusarium* entre os genótipos de soja sem sintomas de SMS pode estar relacionada à produção

desses exsudatos que seriam mais favoráveis à multiplicação de algumas espécies do patógeno do que para outras, mas sem capacidade de infecção. Além disso, também pode ter havido uma pressão de seleção entre espécies melhor adaptadas e com maior competência em rizosfera para se estabelecer e colonizar a porção radicular de determinados genótipos. Para a supressão do patógeno, fatores como teor de matéria orgânica do solo, processos de decomposição e ciclagem de nutrientes, tipo de solo e de agente patogênico, estação de cultivo e tipo de planta cultivada possuem interferência direta (TERMORSHUIZEN et al., 2006).

Com relação à *Trichoderma*, observou-se que o maior número de isolados foi obtido a partir do genótipo CEPSTRR 06006 RR, seguido do genótipo CEPSTRR 06002 RR, independentemente da presença

ou não de sintomas de SMS nas plantas (Figura 2). Nos genótipos CEPS 06015 RR e FUNDACEP 55 RR também foi observado maior número de unidades formadoras de colônias de *Trichoderma* em amostras de solo coletadas em plantas com SMS. Por outro lado, o genótipo FUNDACEP 55 RR não apresentou isolados de *Fusarium* spp. proveniente de raízes (Tabela 2), o que poderia estar relacionado à elevada densidade populacional de *Trichoderma*

spp. na rizosfera das plantas de soja com sintomas de Síndrome da Morte Súbita. As amostras oriundas do genótipo FUNDACEP 53 RR, com SMS, mostraram diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônias de *Trichoderma*. Neste trabalho, fungos do gênero *Trichoderma* estiveram associados ao solo rizosférico de soja, tanto em plantas com e sem sintomas de SMS, sendo capazes de se estabelecerem também em um ambiente em que ocorre a predominância do patógeno.

**Tabela 2.** Espécies de *Fusarium* associadas ao sistema radicular de genótipos de soja, com sintomas de Síndrome da Morte Súbita (SMS), em sistema plantio direto. Santa Maria, RS, 2008.

Código de identificação	Genótipo de soja	Espécies e descritores
F001d	FUNDACEP 53 RR	<i>F. avenaceum</i> (Fr.) Sacc. 1886
F002d	CEPS 06002 RR	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. 1881
F010dA	CEPS 06010 RR	<i>F. oxysporum</i> Schlecht.
F010dB	CEPS 06010 RR	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. 1881
F031d	CEPS 06031 RR	<i>F. graminearum</i> Schwabe 1839
F005d	CEPS 06005 RR	<i>F. verticillioides</i> J. Sheld. 1904
F006dA	CEPS 06006 RR	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. 1881
F006dB	CEPS 06006 RR	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. 1881
F015d	CEPS 06015 RR	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. 1881

<sup>1)</sup>F: *Fusarium* spp.; F\_\_: nome do genótipo de soja do qual o isolado foi obtido; d: isolado de solo rizosférico de plantas com sintomas da doença; A ou B: isolados morfológicamente diferentes de um mesmo genótipo.

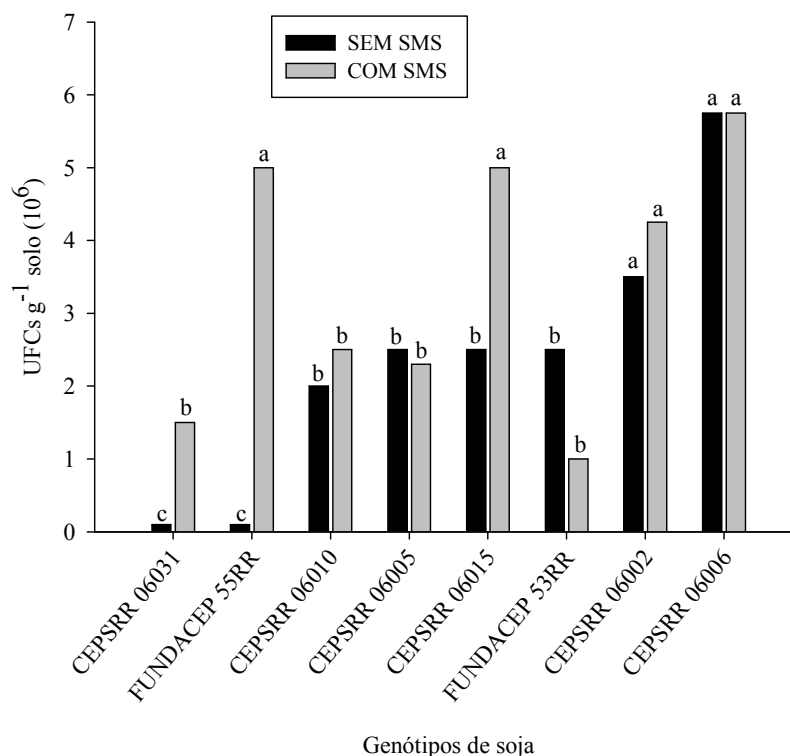
**Fonte:** Elaboração dos autores.

Quando a planta de soja é atacada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, as raízes produzem quantidades suficientes de gliceolina, uma fitoalexina que atua em resposta à infecção pelo patógeno. Este pode ser um fator importante no fornecimento de resistência parcial a esse fungo e varia conforme o genótipo de soja (LOZOVAYA et al., 2006). Diferenças na composição dos exsudatos radiculares liberados pelas plantas condicionariam, beneficiando

ou prejudicando, a composição microbiana da rizosfera (AIRA et al., 2010). Na área em que foram realizadas as coletas das amostras utilizadas no presente trabalho, a rotação de culturas incluía soja/milho durante o verão, e azevém ou trigo nos meses de inverno. Essas rotações, ou algumas delas, podem ter influenciado as populações do patógeno e do antagonista, beneficiando-as ou prejudicando-as.



**Figura 2.** População de *Trichoderma* spp. em solo rizosférico de genótipos de soja, com e sem sintomas de Síndrome da Morte Súbita (SMS), em sistema plantio direto. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis. Santa Maria, RS, 2007.



Fonte: Elaboração dos autores.

Entre os isolados de *Fusarium*, foram identificadas morfológicamente nove espécies obtidas de raízes de plantas com SMS e os resultados encontram-se na Tabela 2. Embora outras espécies tenham sido identificadas, *F. solani* foi a mais evidente, o que indicaria grande possibilidade de ocorrência de SMS, em safras seguintes, na área em que as amostras foram coletadas. As espécies *F. avenaceum* e *F. graminearum*, poderiam ser remanescentes da cultura anterior (restos culturais), já que essa área foi cultivada com trigo e/ou azevém durante o inverno.

Com relação à seleção de isolados de *Trichoderma* com potencial antagônico a *Fusarium* houve diferença significativa entre os advindos de plantas com e sem SMS, somente para quatro

isolados do patógeno (Tabela 3). Os isolados F010dA e F005d de *Fusarium*, confrontados com *Trichoderma* de plantas sem sintomas de SMS, e os isolados F010dB e F006dA, confrontados com *Trichoderma* de plantas com SMS, foram mais sensíveis ao antagonista, com notas no teste de confrontação direta mais próximas a 1. Os relatos de que haveria uma pressão de seleção do meio (planta doente) sobre a eficiência do antagonismo se comprovaram neste trabalho, pois os antagonistas mais eficazes foram aqueles associados à rizosfera de plantas com sintomas da doença, controlando três (T53d, T55d) ou quatro (T002dA, T002dB e T031d) isolados de *Fusarium* (Tabela 4).

Esses seis isolados de *Trichoderma* foram submetidos à análise da região ITS1-5.8S-ITS2 e,

após a comparação com sequências depositadas no *GenBank*, verificou-se que todos tiveram similaridade com espécies do agregado *T. koningii*, fornecendo indícios de que os isolados sequenciados

possam pertencer a alguma dessas espécies (Tabela 1 e Figura 3). Isso pode ser observado através de um elevado suporte de *bootstrap* (igual a 100) entre o clado formado pelo agregado *T. koningii* e o clado *T. harzianum*.

**Tabela 3.** Classes de antagonismo (médias das notas) do teste de confrontação direta obtidas pelos isolados de *Trichoderma* sp., oriundos de solo rizosférico de soja com e sem sintomas de Síndrome da Morte Súbita (SMS), em função de isolados de *Fusarium* spp. Santa Maria, RS, 2008.

<i>Fusarium</i> spp. <sup>(1)</sup>	Classes de antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. <sup>(2)</sup>		Nível de <i>p</i> <sup>**</sup>
	Plantas com SMS	Plantas sem SMS	
F001d	1,78	2,00	0,16 <sup>ns</sup>
F002d	1,65	1,62	0,76 <sup>ns</sup>
F010dA	2,06	1,08	0,00 *
F010dB	1,50	2,75	0,00 *
F031d	2,93	3,12	0,67 <sup>ns</sup>
F005d	2,34	1,75	0,04 *
F006dA	1,62	2,00	0,03 *
F006dB	1,75	1,87	0,36 <sup>ns</sup>
F015d	1,53	1,83	0,11 <sup>ns</sup>

<sup>(1)</sup>F: *Fusarium* spp.; F\_\_: nome do genótipo de soja do qual o isolado foi obtido; d: isolado de solo rizosférico de plantas com sintomas da doença; A ou B: isolados morfologicamente diferentes de um mesmo genótipo. <sup>(2)</sup>Classes de antagonismo (adaptado de CARVALHO et al., 2011). 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 (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982); (\*) significativo; (<sup>ns</sup>) não significativo pelo Teste U de Mann-Whitney. (*p*<sup>\*\*</sup>) Probabilidade de erro (*p* < 0,05).

**Fonte:** Elaboração dos autores.

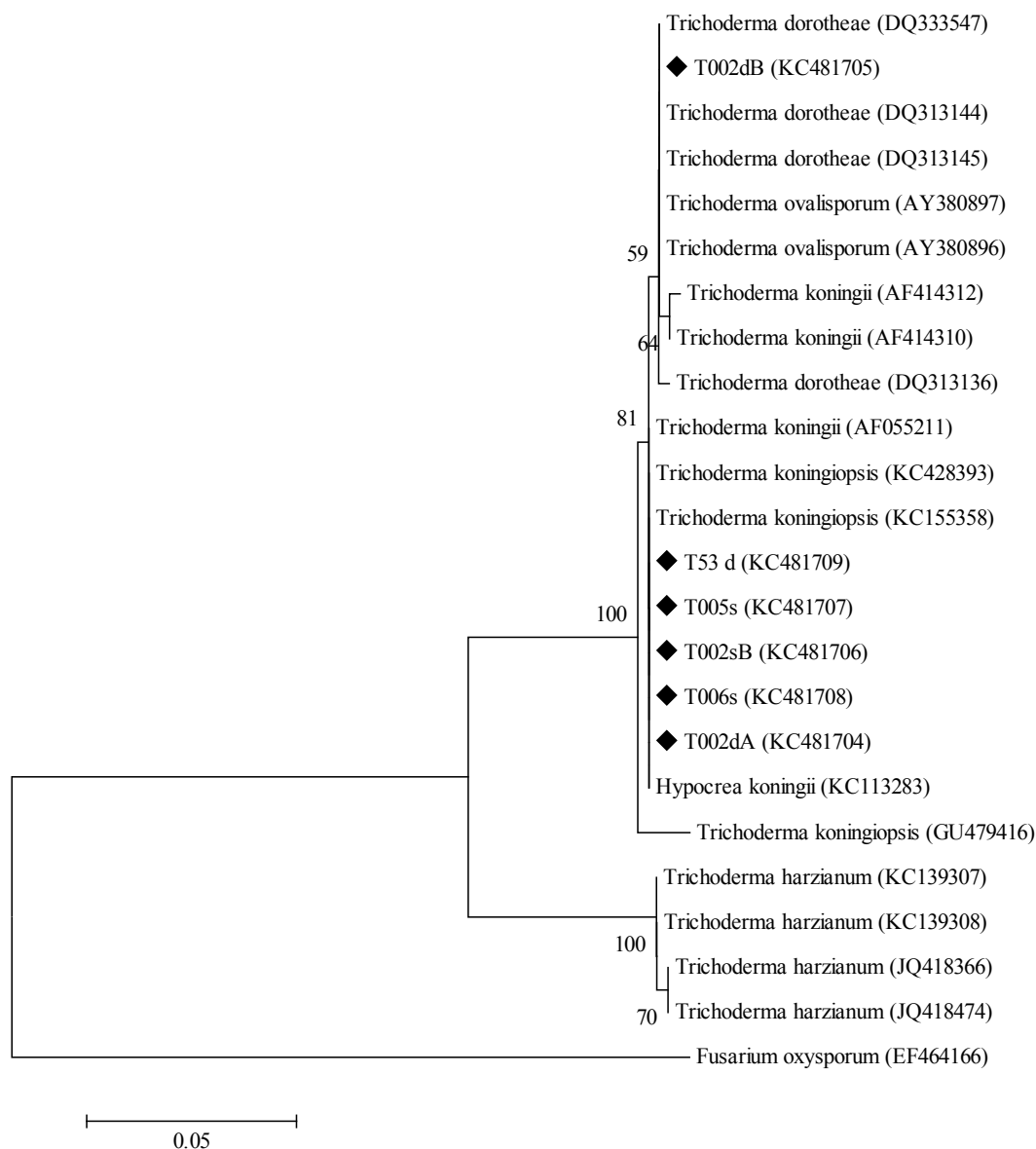
**Tabela 4.** Isolados de *Trichoderma* sp. mais competitivos no teste de confrontação direta (classe de antagonismo 1) frente a isolados de *Fusarium* spp. de plantas com Síndrome da Morte Súbita (SMS). Santa Maria, RS, 2008.

Isolados de <i>Trichoderma</i> sp.*	Isolados de <i>Fusarium</i> spp.* controlados
T53d	F010dB, F006dA e F015d
T55d	F010dB, F006dA e F002d
T002dA	F001dA, F010dB, F002d e F015d
T002dB	F010dB, F002d, F015d e F001d
T031d	F010dB, F00d2, F015d e F001dA
T006s	F010dA
T005s	F005d
T002sB	F010dA

(\*) Isolados seguidos pelas letras T: *Trichoderma* sp. e F: *Fusarium* spp.; T\_\_ e F\_\_: nome do genótipo de soja do qual o isolado foi obtido; “d” ou “s”: isolado de solo rizosférico de plantas com ou sem sintomas da doença; “A” ou “B”: isolados morfologicamente diferentes obtidos de um mesmo genótipo.

**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Figura 3.** Dendograma filogenético baseado no método de "Neighbor-Joining" derivado das sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA amplificadas pelos oligonucleotídeos ITS1 e ITS4, com base em 1000 réplicas de "bootstrap", para isolados de *Trichoderma* sp.: T53d, T005s, T002sB, T006s, T002dA e T002dB. As sequências obtidas e utilizadas nesse estudo, com seus respectivos números de acesso no *GenBank*, estão listadas na Tabela 1. O número nas ramificações representa o número de "bootstrap". *Fusarium oxysporum* (EF464166) foi utilizado como *outgroup*. Santa Maria, 2013.



**Fonte:** Elaboração dos autores.

Contrariamente, os isolados T006s, T005s e T002sB, oriundos de plantas sem SMS, foram eficazes no controle de apenas um isolado de *Fusarium* cada (F010dA e F005d). Estes resultados

revelam que a bioprospecção de isolados de *Trichoderma* antagonistas a *Fusarium* em locais onde há proliferação da doença pode ser uma estratégia promissora, pois pode levar à obtenção de

novas linhagens mais competitivas contra agentes patogênicos.

As espécies de *Trichoderma* podem sobreviver a expensas de carboidratos complexos liberados pela degradação de outros fungos, além da produção de enzimas e antibióticos, expressão de proteínas e biocontrole de fitopatógenos (BENÍTEZ et al., 2004). Nesse sentido, é possível que os isolados de *Trichoderma* sp. avaliados nesse estudo induzam a produção de enzimas quitinolíticas e endoglucanases em células do sistema radicular do hospedeiro, compostos estes também associados ao seu micoparasitismo (ALMEIDA et al., 2007; GAJERA; VAKHARIA, 2010). *T. koningiopsis*, apesar de ser considerado cosmopolita, é mais comum em latitudes de clima tropical do que clima temperado, pois frequentemente são obtidos isolados dessa espécie como endofíticos em *Theobroma* spp. Também constitui uma espécie agregada a *T. koningii* Oudem. 1902, 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; OSTERRIETH; CABELLO, 2001). Dal Soglio et al. (1998) observaram a presença de enzimas quitinolíticas ao avaliarem o efeito de tratamentos compostos por filtrados de cultura de *T. harzianum* Rifai 1969, isolado Th008, aplicados em sementes de soja, inoculadas com um isolado de *Rhizoctonia solani*. Os autores evidenciaram a presença de três enzimas quitinolíticas na rizosfera das plântulas de soja 15 dias após a emergência.

Uma das características atreladas ao controle biológico que *Trichoderma* spp. possuem é a produção de enzimas líticas extracelulares que degradam a parede celular de outros fungos. Além disso, indivíduos desse gênero são importantes na ciclagem de nutrientes e, em alguns casos, vêm sendo utilizados para a produção de celulase em escala comercial (CORABI-ADELL; LUCON;

KOIKE, 2002). As interações antagonísticas desenvolvidas na rizosfera melhoram o crescimento das plantas (HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009) e a sanidade das mesmas, colaborando para a manutenção da qualidade do solo e dos agroecossistemas (BAREA; AZCÓN; AZCÓN-AGUILAR, 2002), já que a competência de rizosfera é uma característica importante para a seleção de agentes de controle biológico (HARMAN et al., 2004).

Esse resultado pode indicar alta capacidade antagonista aos isolados de *Fusarium* avaliados e aponta que os isolados de *Trichoderma* sp. testados podem apresentar um elevado potencial para utilização em um manejo integrado de doenças radiculares na cultura da soja. Além disso, esse estudo também demonstrou que *Trichoderma* sp. poderia apresentar um caráter agressivo, sendo capaz de se estabelecer em um dado ambiente (mesmo com uma maior pressão do patógeno, conforme os resultados acima apresentados), desde que dadas às condições apropriadas para tal, prevalecendo sobre outras espécies.

Os isolados de *Fusarium* F010dA (*F. oxysporum*), F015d (*F. solani*), F002d (*F. solani*) e F001d (*F. avenaceum*) foram os que tiveram um maior número de isolados de *Trichoderma* sp. capazes de controlá-los, indicando que esses isolados do patógeno poderiam ser mais sensíveis à ação do antagonista. Também não pode ser desconsiderado o fato de que essas espécies de *Fusarium* não seriam tão agressivas. Ethur et al. (2005), avaliando fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 1884, relataram que além da variabilidade entre isolados de *Trichoderma* pode-se encontrar também diferenças na ação desses dependendo da temperatura, umidade e tipo de solo.

Selecionando isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Sclerotium rolfisii* Sacc. em soja, Lohmann et al. (2007) observaram que os isolados I, II e III do antagonista, oriundos de três amostras de solo coletadas em diferentes áreas, apresentaram

efeito controlador sobre o patógeno, provocando menor incidência de *damping off* em plântulas de soja. Além disso, a contagem de conídios dos isolados de *Trichoderma* spp. I e II foi maior quando comparada ao isolado III, sendo os primeiros mais agressivos e capazes de dominar o ambiente, controlando o fitopatógeno.

Os isolados de *Trichoderma* spp. T53d, T55d, T002dA, T002dB e T031d, oriundos de solo rizosférico de genótipos de soja com sintomas de SMS, apresentaram maior capacidade antagônica aos isolados de *Fusarium* spp. testados. Em comparação com outros autores, foi observado que os isolados de *Trichoderma* sp. que obtiveram nota 1 no teste de confrontação direta foram mais competentes em se estabelecer na rizosfera dos genótipos de soja estudados e poderiam ter atuado sobre as condições ambientais do solo, modificando-as, disputando nutrientes e espaço com o fitopatógeno.

É importante ressaltar que ainda há uma carência de respostas acerca das interações entre antagonistas e o patossistema soja-SMS, visto que a utilização do controle biológico de doenças, compondo um manejo integrado, atrai considerável interesse de produtores rurais e empresas, que integram um nicho de mercado voltado à sustentabilidade na agricultura. A realização de testes em casa-de-vegetação e a seleção de novos isolados de *Trichoderma* sp., entre outras espécies do fungo, juntamente com estudos de sua variabilidade genética, enfatiza a importância pela busca de novas perspectivas para emprego do controle biológico no manejo de SMS e outras doenças causadas por patógenos de solo na soja.

## Conclusões

Nos genótipos de soja CEPS 06006 RR, CEPS 06002 RR, FUNDACEP 53 RR, CEPS 06010 RR, CEPS 06005 RR, CEPS 06015 RR, FUNDACEP 55 RR e CEPS 06031 RR, a população de *Fusarium* spp. em solo rizosférico difere em quantidade

apenas entre genótipos sem sintomas de Síndrome da Morte Súbita e *Trichoderma* spp. está associado ao solo rizosférico em soja, tanto em plantas sem sintomas de Síndrome da Morte Súbita quanto em plantas com sintomas da doença, em quantidades diferentes nos diferentes genótipos estudados.

Os isolados de *Trichoderma* spp. T55d e *Trichoderma* sp. T53d, T002dA, T002dB e T031d, de solo rizosférico de genótipos de soja com sintomas de Síndrome da Morte Súbita, apresentam maior capacidade antagônica a *Fusarium* spp. e podem ser utilizados em testes a campo, envolvendo os genótipos das quais foram obtidos, entre outros, a fim de verificar se o antagonismo é mantido e buscar o controle biológico da doença.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudo; à FUNDACEP/CCGL por viabilizar a coleta de solo em sua área experimental; e aos revisores anônimos pelas importantes sugestões e correções.

## Referências

- AIRA, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; LAZCANO, C.; BÄÄTH, E.; DOMÍNGUEZ, J. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, v. 42, n. 12, p. 2276-2281, 2010.
- ALMEIDA, F. B.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, Netherlands, v. 29, n. 8, p. 1189-1193, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFON, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Research*, Bethesda, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- 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, n. 3, p. 162-183, 2005.
- BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v. 81, n. 1-4, p. 343-351, 2002.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4. ed. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, Spanish, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- CARTER, M. R. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Boca Raton: CRC Press, 1993. 823 p.
- CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. 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.
- COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, Saint Paul, v. 31, n. 1, p. 53-80, 1993.
- COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC – CQFS-RS/SC. *Recomendações de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina*. 3. ed. Passo Fundo: SBCS – Núcleo Região Sul/ UFRGS, 2004. 400 p.
- CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 69, p. 158-191, 2002. Suplemento
- DAL SOGLIO, F. K.; BERTAGNOLLI, B. L.; SINCLAIR, J. B.; YU, G. Y.; EASTBURN, D. M. Production of chitinolytic enzymes and endoglucanase in the soybean rhizosphere in the presence of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, Orlando, v. 12, n. 2, p. 111-117, 1998.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Ithaca, v. 12, p. 13-18, 1990.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro nacional de pesquisa de solos. Ministério da agricultura e do abastecimento. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: EMBRAPA, 1999. 412 p.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; DA SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. R.; DA ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia brasileira*, Brasília, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.
- ETHUR, L. Z.; DA ROCHA, E. K.; MILANESI, P.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. *Ciência e natureza*, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 17-27, 2006.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; NICOLINI, C.; MILANESI, P.; FORTES, F. O. 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, n. 1, p. 19-26, 2008.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. *Stages of soybean development* (Special report, 80). Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11 p.
- FERNANDES, M. R. *Manual para laboratório de fitopatologia*. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 P.
- FREITAS, T. M. Q.; MENEGHETTI, R. C.; BALARDIN, R. S. Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. *Ciência rural*, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 991-996, 2004.
- GAJERA, H. P.; VAKHARIA, D. N. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and molecular plant pathology*, United States, v. 74, n. 3-4, p. 274-282, 2010.
- GERLACH, W.; NIRENBERG, H. *The genus Fusarium: a pictorial atlas*. Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land-und. Institut Für Mikrobiologie, 1982. 406 p.
- GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *European Journal of Soil Biology*, Braunschweig, v. 38, n. 1, p. 85-88, 2002.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO,

- A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.
- 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, n. 1, p. 4-10, 2003.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, United States, v. 51, n. 3, p.409-416, 2009.
- LARKIN, R. P.; FRAVEL, D. R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of fusarium wilt of tomato. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 82, n. 9, p. 1022-1028, 1998.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. *The Fusarium laboratory manual*. Iowa: Blackwell Professional, 2006. 385 p.
- LOHMANN, T. R.; PAZUCH, D.; STANGARLIN, J. R.; SELZLEIN, C.; NACKE, H. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. *Revista Brasileira de Agroecologia*, Cruz Alta, v. 2, n. 2, p. 1665-1668, 2007.
- LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; LI, S.; WIDHOLM, J. M.; HARTMAN, G. L. Lignin degradation by *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 90, n. 1, p. 77-82, 2006.
- MENEZES, J. P. *Caracterização populacional e molecular; e seleção de Trichoderma spp. para biocontrole de Fusarium sp. em crisântemo*. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- MORENO, J. A. *Clima do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961. 73 p.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 407-447.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. Philadelphia: Pennsylvania State University Press, 1983. 192 p.
- OYARBIDE, F.; OSTERRIETH, M. L.; CABELLO, M. *Trichoderma koningii* as a biomineralizing fungus agent of calcium oxalate crystals in typical Argiudolls of the Los Padres Lake natural reserve (Buenos Aires, Argentina). *Microbiological Research*, Germany, v. 156, n. 2, p. 113-119, 2001.
- PEREIRA, J. C. *Interações entre as populações de actinobactérias e outros organismos na rizosfera*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 15 p. (Documentos, 118).
- RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ, T. C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 321, n. 1-2, p. 341-361, 2009.
- ROY, K. W.; RUPE, J. C.; HERSHMAN, D. E.; ABNEY, T. S. Sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1100-1111, 1997.
- SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; PETRINI, O.; SCHROERS, H. J.; DRUZHININA, I. S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 56, n. 1, p. 67-133, 2006.
- SIEGEL, S.; CASTELLAN, N. J. *Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 448 p.
- SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, Minnesota, v. 79, n. 2, p. 198-203, 1989.
- TERMORSHUIZEN, A. J.; VAN RIJN, E.; VAN DER GAAG, D. J.; ALABOUVETTE, C.; CHEN, Y.; LAGERLOF, J.; MALANDRAKIS, A. A.; PAPLOMATAS, E. J.; RAMERT, B.; RYCKEBOER, J.; STEINBERG, C.; ZMORANAHUM, S. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: variability in pathogen response. *Soil Biology & Biochemistry*, Netherlands, v. 38, n. 8, p. 2461-2477, 2006.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 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.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

